

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Fertilización *in-vitro* con espermatozoides criopreservados de la especie
Rhinella marina e identificación de malformaciones en los embriones
obtenidos.

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias
Biológicas

BELÉN ESTEFANÍA PROAÑO OLMOS

Quito, 2013

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Belén Estefanía Proaño Olmos ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Oscar Pérez

Director de Disertación

Quito, 7 de octubre del 2013

A mis abuelitos,

Segundo Olmos y Hortencia Mora.

AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por las instalaciones, facilidades y financiamiento mediante el proyecto “Investigación de la oogenésis y fertilización *in-vitro* de anuros ecuatorianos”, bajo los cuales se realizó esta tesis.

Al Dr. Oscar Pérez, por la dirección entusiasta y siempre presta a esta investigación, también gracias por su amistad.

A los laboratorios dirigidos por la Dra. Alexandra Narváez, el Dr. Rómel Montúfar y el Dr. Santiago Ron, por permitirme usar las ultracongeladoras. Gracias a Carolina Portero, Ana Troya y Gabriela Castillo por abrirlas cuando lo necesité.

Al laboratorio de Citogenética de la Dra. Myriam Rivera, por permitirme usar el microscopio con fluorescencia.

A toda mi familia por su apoyo, motivación y disposición. De manera especial a mis padres, a mis abuelos, a mis tíos, Jenny y Mario, y mi prima Mary.

A mis amigas del Laboratorio de Biología del Desarrollo 115, por su colaboración en la colección de animales y en los ensayos. También gracias a Andrea León.

A mis buenos amigos, Esther y Jaime, por escucharme y permitirme escucharlos.

A Juan, por reír y soñar junto a mí durante toda esta carrera.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	12
2. ABSTRACT	13
3. INTRODUCCIÓN	14
3.1. VARIABILIDAD GENÉTICA.....	15
3.2. CRIOPRESERVACIÓN.....	16
3.2.1. Enfriamiento.....	18
3.2.2. Congelamiento	19
3.2.3. Descongelamiento.....	20
3.3. TIPOS DE CRIOPRESERVACIÓN.....	21
3.3.1. Vitricación.....	21
3.3.2. Congelamiento lento.....	21
3.3.3. Crioprotectores	22
3.3.4. Estructura general de los espermatozoides.....	24
3.4. ORGANISMO DE ESTUDIO.....	26
4. METODOLOGÍA	28
4.1. COLECCIÓN Y MANUTENCIÓN DE INDIVIDUOS.....	28
4.2. SOLUCIONES.....	28
4.3. COLECCIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS MASCULINOS	29

4.4. DESCONGELAMIENTO Y REVISIÓN DE DAÑOS EN LOS ESPERMATOZOIDES.....	30
4.5. FUNCIONALIDAD DE ESPERMATOZOIDES EN FERTILIZACIONES <i>IN-VITRO</i>	31
4.6. EFECTO DEL DMSO EN EL DESARROLLO DE LOS EMBRIONES.....	32
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	32
5. RESULTADOS.....	34
5.1. EFECTOS DEL CONGELAMIENTO Y DE LOS TRATAMIENTOS EN LA ESTRUCTURA Y CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES.....	34
5.2. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS EN LA FUNCIONALIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES.....	35
5.3. EFECTO DEL DMSO EN EL DESARROLLO DE LOS EMBRIONES.....	36
6. DISCUSIÓN.....	39
7. LITERATURA CITADA.....	48
8. FIGURAS.....	54
9. TABLAS.....	68
10. ANEXOS.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efectos del congelamiento en espermatozoides de *R. marina* descongelados a los seis meses.

Figura 2. Espermatozoides provenientes de una muestra fresca en solución SB e incubada con los tintes PI y Hoescht.

Figura 3. Espermatozoides de *R. marina* descongelados a los seis meses incubados con los tintes PI y Hoescht.

Figura 4. Concentración de espermatozoides descongelados a la semana en relación con la concentración de DMSO.

Figura 5. Concentración de espermatozoides descongelados a los seis meses en relación con la concentración de DMSO.

Figura 6. Medidas de espermatozoides de *R. marina* que no han sido sometidos a congelamiento/descongelamiento.

Figura 7. Porcentajes de fertilizaciones exitosas (gástrulas) mediante fertilizaciones *in-vitro* con espermatozoides descongelados a temperatura ambiente en relación a la concentración de DMSO.

Figura 8. Porcentajes de fertilizaciones exitosas (gástrulas) mediante fertilizaciones *in-vitro* con espermatozoides descongelados a 4°C en relación a las concentraciones de DMSO.

Figura 9. Porcentajes de fertilización obtenidos con espermatozoides descongelados a temperatura ambiente y a 4°C según el porcentaje de DMSO.

Figura 10. Porcentaje de malformaciones en larvas de *R. marina* obtenidas mediante fertilización *in-vitro* con espermatozoides descongelados a 4°C en relación a la concentración de DMSO.

Figura 11. Malformaciones encontradas durante el estadio 19 en embriones de *R. marina* según el IDA.

Figura 12. Malformaciones encontradas embriones de *R. marina* en estadio 19.

Figura 13. Malformaciones en embriones de *R. marina* en estadio 21.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de espermatozoides descongelados después de permanecer una semana a -80°C comparados con un control que no fue sometido al congelamiento/descongelamiento.

Tabla 2. Concentración de espermatozoides descongelados a los 6 meses comparados con los datos control.

Tabla 3. Diferencias entre concentración de espermatozoides descongelados después de una semana y 6 meses. Valores de P obtenidos mediante la prueba de Wilcoxon.

Tabla 4. Porcentaje de fertilizaciones exitosas (gástrulas) mediante fertilizaciones *in-vitro* con espermatozoides descongelados a temperatura ambiente.

Tabla 5. Porcentaje de fertilizaciones exitosas (gástrulas) mediante fertilizaciones *in-vitro* con espermatozoides descongelados a 4°C .

Tabla 6. Porcentaje de malformaciones en larvas de *R. marina* obtenidas mediante fertilizaciones *in-vitro* con espermatozoides descongelados a 4°C .

Tabla 7. Porcentajes de malformaciones en embriones de *R. marina* obtenidos con espermatozoides descongelados a 4°C .

Tabla 8. Metamorfos obtenidos en las repeticiones de cada tratamiento.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Diagrama de espermatozoide consenso de la familia Bufonidae-Pelodriadae (Lee y Jamieson, 1993).

Anexo 2. Tamaño del espermatozoide de *R. marina* de Australia descrito por Lee y Jamieson en 1993.

Anexo 3. Tabla parcial de desarrollo de *Rhinella marina* (Bautista, 2012).

Anexo 4. Índice dorsoanterior (IDA) para malformaciones en embriones de *Xenopus laevis* (Sive *et al.*, 2000).

Anexo 5. Test de homogeneidad de varianzas para datos correspondientes a la concentración de espermatozoides de muestras descongeladas en febrero.

Anexo 6. Pruebas de homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos correspondientes a porcentajes de fertilización obtenidos con espermatozoides descongelados a temperatura ambiente.

Anexo 7. Prueba de homogeneidad de varianzas para datos de porcentaje de malformaciones en embriones con espermatozoides descongelados a 4°C en cada tratamiento.

1. RESUMEN

El desarrollo de bancos de gametos es una herramienta útil para la conservación de especies amenazadas. La criopreservación de espermatozoides ha sido estandarizada en una variedad de organismos pero en anuros continúa en fase experimental, a pesar de los graves declives poblacionales que este grupo ha experimentado. Ecuador tiene un 28.8% de especies amenazadas, por lo que la elaboración de estos protocolos es urgente. En este estudio se criopreservaron los espermatozoides de *Rhinella marina* a -80°C, mediante un congelamiento paulatino y con tres concentraciones de Dimetil Sulfóxido (DMSO): 5%, 10% y 15%, como crioprotector. Una alícuota de cada tratamiento se descongeló después de una semana y, otra, luego de seis meses. Con la primera se realizaron fertilizaciones *in-vitro* y, con la segunda, se evaluó el estado de la membrana mediante tintes fluorescentes. Se encontraron daños en la membrana plasmática y reducción en el número de espermatozoides sometidos a congelamiento/descongelamiento. La concentración de DMSO al 10% protegió a una mayor cantidad de espermatozoides de la lisis celular. No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de fertilización entre las tres concentraciones de DMSO. La concentración de espermatozoides se mantiene constante sin importar el tiempo que permanezcan congelados, aunque no así su funcionalidad. Los embriones se mantuvieron hasta el estadio 21 para probar la toxicidad del DMSO. En todos los tratamientos, incluso en el control, se encontraron embriones con malformaciones, pero la solución de DMSO al 15% produjo un 2.33% más de individuos malformados que el control. Se recomienda realizar experimentos en los que se modifique la tasa de enfriamiento, pues así se incrementarían los porcentajes de fertilización.

Palabras clave: criopreservación, DMSO, fertilización *in-vitro*, malformaciones, *Rhinella marina*.

2. ABSTRACT

The development of Sperm Banks is a useful tool for the conservation of threatened species. Although sperm cryopreservation has been standardized for several organisms, it is still in experimental phase in anurans, despite the severe population declines that this group has passed through. Standardization of these techniques in Ecuador should be a priority because 28.8% of species are threatened. For this investigation, the sperm of *Rhinella marina* were cryopreserved by a moderate freezing rate with Dimethyl Sulfoxide (DMSO) as cryoprotectant at 3 concentrations: 5%, 10% and 15%. One sample of each treatment was thawed after one week and another after 6 months. *In-vitro* fertilizations were achieved only for the first sample, and the second one was assessed for membrane integrity through fluorescent dyes. There were cells with membrane injuries and reduction in sperm concentration when the samples were frozen/thawed. The 10% DMSO solution protected more sperm cells from cryoinjury than the other concentrations of DMSO. Percentages of fertilization among the three concentrations of DMSO did not present significative differences. The sperm concentration was constant along the time of preservation, but not its viability. The embryos were maintained until stage 21 for testing toxicity of DMSO. There were abnormal embryos in all the treatments, even in control treatment, but DMSO 15% presented 2.3% more abnormal embryos than the rest of treatments. Further experiments should modify the cooling rate in order to improve fertilization rates.

Key words: abnormalities, cryopreservation, DMSO, *in-vitro* fertilization, *Rhinella marina*.

3. INTRODUCCIÓN

Los anfibios constituyen un grupo muy diverso que, desde mediados del siglo XX, ha experimentado notables declinaciones poblacionales a nivel mundial (Young *et al.*, 2001). En la actualidad un tercio del número total de especies se encuentra amenazado, es decir, 1856 especies de un total de 6300 especies conocidas (AmphibiaWeb, 2009). En 1989 se acepta formalmente el problema y desde entonces se han buscado las causas y posibles soluciones frente a esta crisis (Young *et al.*, 2001; Browne y Figiel, 2011).

Las causas son algunas: cambios en temperatura y precipitación; modificación y fragmentación de hábitat; incremento de radiación UV-B; lluvia ácida; contaminantes químicos; e introducción de especies y enfermedades emergentes; o una acción sinérgica de varios de estos factores (Young *et al.*, 2001).

En Centroamérica y América Latina que albergan, aproximadamente, la mitad de la diversidad mundial de anfibios, existe un 39% de especies en peligro de extinción, de las cuales un 12% está críticamente amenazado (Bolaños *et al.*, 2008). En Ecuador, de un total de 537 especies, un 12.7% se encuentra en peligro y un 8.6% está en peligro crítico (Ron *et al.*, 2011). Las medidas en estas regiones han sido: monitoreos constantes en determinadas áreas, búsqueda de patrones ambientales e históricos que puedan explicar las declinaciones, realización de una adecuada clasificación taxonómica para conocer la verdadera situación actual del lugar y programas de conservación *ex-situ* (Young *et al.*, 2001).

Según la IUCN (International Union for the Conservation of Nature) y la WAZA (World Association of Zoos and Aquariums) una de las medidas prioritarias a nivel mundial para hacer frente a este problema deber ser la implementación de Programas de Conservación *ex-situ* (Young *et al.*, 2001; Browne *et al.*, 2011). La meta de estos programas es que

poblaciones genéticamente representativas se mantengan sanas, con ciclos de reproducción normales y con variabilidad genética para, posteriormente, ser reintroducidas (Browne *et al.*, 2011).

La criopreservación de gametos masculinos se ha convertido en una herramienta importante para mantener la variabilidad genética de poblaciones amenazadas de una manera práctica y con la ventaja adicional de minimizar los gastos de manutención de la gran cantidad de individuos saludables que requieren los programas de conservación *ex-situ* (Clulow *et al.*, 1999; Browne y Figiel, 2011).

3.1. VARIABILIDAD GENÉTICA

La pérdida de variabilidad genética en las poblaciones incrementa la susceptibilidad a enfermedades y afecta la reproducción, poniendo en peligro los programas no sólo por la disminución de la población en cautiverio, sino también porque los individuos a liberarse resultarían incompetentes genéticamente (Browne y Figiel, 2011; Browne *et al.*, 2011).

La conservación de la variabilidad genética es la mayor meta de los programas de conservación *ex-situ* y, además, es de importancia para la investigación y el sector comercial pero, con enfoques distintos: para el campo de la Biología del Desarrollo y la Biotecnología se trata de la fuente potencial de nuevas variantes para su uso en diferentes áreas (Browne y Figiel, 2011). Por ejemplo las especies *Gastrotheca riobambae* (Moya *et al.*, 2006), *Epipedobates machalilla* (del Pino *et al.*, 2004) y *Xenopus laevis*, que han sido usadas para describir los patrones de desarrollo en anfibios y, en el caso de la última especie, para proyectos de línea germinal y mapas de destino (Gilbert, 2010; Browne y Figiel, 2011).

En el ámbito comercial, los criaderos de anfibios con utilidad para el hombre siempre buscan mejorar las características de estos animales para su comercialización. Las

especies *Rana catesbeiana* y *Andrias davidianus* son usadas para consumo humano (Browne y Figiel; 2011) y, además, son fuente de químicos antimicrobianos. Para este último propósito también se usan las especies *Xenopus laevis*, *Bombina* sp. y *Phyllomedusa* sp. (Clark *et al.*, 1994).

Como ya se dijo antes, la conservación de esta variabilidad genética es una de las principales metas a cumplirse para frenar la pérdida de diversidad que actualmente se experimenta. Las Tecnologías de Reproducción Asistida (TRA) han sido muy útiles para ello, e incluyen: inducción hormonal para la liberación de gametos masculinos y femeninos; criopreservación de gametos, embriones y células germinales; androgénesis y clonación (Clulow *et al.*, 1999).

Entre las TRA que ha recibido mayor atención y presentado más resultados está la criopreservación de gametos masculinos por su beneficios: reducción en costos de manutención, protección contra enfermedades, suplementación continua de gametos y potencial para mantener la información genética de un número representativo de individuos (Viveiros y Godhino, 2009).

Bancos Genéticos ya cuentan con los espermatozoides de alrededor de 40 especies de mamíferos (Fickel *et al.*, 2007) y más de 200 especies de peces de agua dulce y salada (Tiersch, 2001). En anfibios sólo se ha tenido éxito en 12 especies, de las cuales 6 están restringidas a Australia (Beesley *et al.*, 1998; Browne *et al.*, 1998; Clulow *et al.*, 1999; Sargent & Mohun, 2005).

3.2. CRIOPRESERVACIÓN

En la naturaleza existen animales poiquiloterms capaces de soportar temperaturas bajo cero mediante dos estrategias: superenfriamiento o congelamiento de órganos internos (animales tolerantes al congelamiento). Para vertebrados, en el primer caso tenemos a la

tortuga *Chrysemis picta* (Lee y Costanzo, 1998); mientras que en el segundo, están 6 especies de anfibios, 1 especie de serpiente y 3 especies de tortugas tolerantes al congelamiento (Lee y Costanzo, 1998; Costanzo y Lee, 1994).

La especie más estudiada ha sido el anuro norteamericano *Rana sylvatica*, que puede sobrevivir después de mantenerse por semanas a temperaturas corporales de entre -3°C y -6°C gracias a varios mecanismos: sobreproducción de glucosa como crioprotector; aceleración y mantenimiento del ritmo cardíaco (una vez iniciado el congelamiento); deshidratación de órganos y redistribución del agua hacia sacos linfáticos y cavidad celómica (Costanzo *et al.*, 1993). Estas estrategias se han reportado en otras especies de animales, lo que hace especial a *R. sylvatica* es su tolerancia a la hiperglicemia y a la hipoxia, y la rapidez con que los mecanismos inician, únicamente, cuando el congelamiento ha comenzado (Costanzo y Lee, 1994; Costanzo *et al.*, 1993).

Ejemplos naturales como éste han sido estudiados desde el siglo XIX y han fomentado el estudio de cualquier material biológico a temperaturas bajo cero (Fuller, 2004; Hoagland y Pincus, 1945) en una rama conocida como Criobiología, la cual comprende la preservación de tejidos o células por largos períodos, criocirugía, liofilización de fármacos y la comprensión de las adaptaciones naturales a bajas temperaturas (Society for Cryobiology, 2013).

El reporte más antiguo de criopreservación, es el de espermatozoides de rana en 1938 (Arav *et al.*, 2002), en la actualidad la criopreservación es una técnica usada en laboratorio para mantener la estructura y funcionalidad de tejidos o células por un período de tiempo indefinido, sometiénolas a temperaturas inferiores al punto de congelamiento del agua (Rubinsky, 2003), se usa en algunos tipos celulares de una variedad de organismos (Polge

et al., 1949; Browne y Figiel, 2011); pero son las células germinales las que han acaparado el 70% de publicaciones hasta el año 2000 (Fuller, 2004).

La base de estos procedimientos es el hecho de que todos los procesos biológicos son reacciones químicas temperatura-dependientes ya que la temperatura afecta tanto a la conformación y funcionalidad normal de las moléculas biológicas, como a las tasas metabólicas (Hill *et al.*, 2008). Por tanto, al reducir la temperatura también se reduce el metabolismo, ya sea de un organismo o de una célula (Rubinsky, 2003).

Otro principio para la preservación de células es que las técnicas son específicas para cada tipo celular, pues cada célula se ha especializado para diferentes funciones y posee diferente constitución. Contemplando esto, se debe trabajar con una solución salina base que sea isotónica al tejido o célula de tal manera que se evite, tanto como sea posible, el estrés osmótico (Arav *et al.*, 2002; Rubinsky, 2003).

Para considerar que una célula ha respondido exitosamente a un tratamiento de criopreservación, ésta debe ser capaz de sobrevivir a los procesos de enfriamiento, congelamiento y descongelamiento (Hammerstedt *et al.*, 1990).

3.2.1. Enfriamiento

Esta fase se caracteriza por la ausencia de cristales de hielo. Dada la reducción de temperatura, la célula reduce su metabolismo y consume menor cantidad de energía y de oxígeno. Sin embargo, puede causar varios desequilibrios en la misma (Rubinsky, 2003).

La membrana plasmática es la más afectada bajo estas condiciones, ya que a temperaturas fisiológicas se encuentra en un estado fluido pero, con el descenso de temperatura, pasa a una fase de transición en la que se alteran las interacciones de sus componentes (proteínas y lípidos) y, por tanto, su funcionalidad (Rubinsky, 2003; Hammerstedt *et al.*, 1990).

En la fase de transición el movimiento de los lípidos se ve restringido y puede haber un reordenamiento de los componentes, donde los lípidos del tipo hexagonal se aglomeren afectando la disposición de las proteínas (Hammerstedt *et al.*, 1990). Esta nueva disposición hace permeable a la membrana dejando entrar grandes cantidades de iones, ocasionando cambios en la composición y la osmolalidad de la célula que, a su vez, pueden causar denaturación de proteínas, edema y daño al citoesqueleto por la activación de fosfolipasas y proteasas (Rubinsky, 2003; Hammerstedt *et al.*, 1990).

Además, la hipotermia puede causar un incremento de radicales libres y acidosis (Rubinsky, 2003). Se cree que estos radicales libres, producto de la respiración aerobia, son los responsables de daños al material genético cuando se produce un desbalance entre éstos y los antioxidantes, conduciendo a un estrés oxidativo (Agarwal *et al.*, 2006; Chetverikova, 2012).

A pesar de ser señalizadores químicos en bajas concentraciones, incluso, cumpliendo un rol en la maduración de espermatozoides (D'Autréaux y Toledano, 2007), se ha relacionado el incremento de radicales libres con la presencia de hileras simples de ADN y fragmentación del mismo, aumento de mutaciones en el ADNmt, mayor porcentaje de metilaciones y pérdida de unos fragmentos con apareamiento de otros en una variedad de organismos expuestos a procesos de enfriamiento, congelamiento y descongelamiento (Chetverikova, 2012).

3.2.2. Congelamiento

Las moléculas de agua forman núcleos de congelamiento de manera aleatoria (un evento probabilístico dependiente del volumen) a partir de -4°C, únicamente, en la matriz extracelular mientras el material citoplasmático permanece en un estado de superenfriamiento (Rubinsky, 2003; Lee y Costanzo, 1998). El superenfriamiento es un

estado natural del agua y de soluciones acuosas que permanecen líquidas aun cuando se encuentran bajo su punto de congelamiento, su límite en la naturaleza es de -40°C , antes de esta temperatura se puede mantener por largos períodos de tiempo a pesar de que el hielo puede formarse en cualquier momento y congelar todo el sistema muy rápidamente (Hill *et al.*, 2008; Lee y Costanzo, 1998).

La formación de hielo fuera de la célula promueve un gradiente osmótico hacia la matriz extracelular, que se ha vuelto hipertónica, ya que el hielo capta muy pocos solutos en él (Rubinsky, 2003). La célula podría perder agua hasta volverse osmóticamente inactiva, a menos que la tasa de enfriamiento sea lo suficientemente rápida para evitar una pérdida excesiva de agua, pero sin causar formación interna de hielo, lo cual también mataría a la célula (Devireddy *et al.*, 2000; Rubinsky, 2003).

Aparte del desequilibrio osmótico, la exposición a estas formaciones de hielo conocidas como dendritas es una de las principales causas de lesiones en las membranas (Rubinsky, 2003). Aunque existen pocos reportes de insectos capaces de sobrevivir al congelamiento de sus células, estos son considerados excepciones (Lee y Costanzo, 1998).

3.2.3. Descongelamiento.

La célula experimenta una rápida ganancia de agua ya que la matriz extracelular se vuelve hiperosmótica, experimentos en protoplasma indican que una membrana no puede expandirse más del 2 al 3% sin romperse, es probable que otra porción de daños celulares se deba a la poca plasticidad de la célula para adaptarse a estos cambios osmóticos. En respuesta a esto la cola del espermatozoide de ovejas y humanos adopta una forma esférica para absorber mayor cantidad de agua con menor expansión (Hammerstedt *et al.*, 1990).

También se ha podido documentar el fenómeno de recrystalización, el cual puede eliminar las células atrapadas entre los cristales, en la mayoría de casos, tasas altas de

descongelamiento eliminan los efectos adversos antes mencionados (Rubinsky, 2003; Devireddy *et al.*, 2000).

3.3. TIPOS DE CRIOPRESERVACIÓN

Se han desarrollado dos tipos de criopreservación: vitrificación y congelamiento lento (Rubinsky, 2003), cada uno ha tenido éxito en algunos tipos celulares. Si bien se ha intentado predecir la efectividad de estas técnicas para cada tipo de célula a congelar, esto no ha sido posible hasta la actualidad. La determinación del tratamiento más adecuado para cada tipo celular continua realizándose de manera empírica, manteniendo el uso del que evite daño celular en la mayor cantidad de la muestra (Fuller, 2004; Sargent y Mohun, 2005).

3.3.1. Vitrificación

La vitrificación es más antigua, usa tasas de enfriamiento rápidas y consiste en la exposición del material biológico a gases líquidos como el Nitrógeno líquido, siendo su punto de ebullición -196°C , ésta es la temperatura generalmente usada (Polge *et al.*, 1949; Parkes, 1945; Hoagland y Pincus, 1942; Rubinsky, 2003). La finalidad de esta técnica es llegar al “estado vidrioso”, un estado sólido amorfo, que conserva las orientaciones moleculares del estado líquido, evitando formación de hielo intra y extracelularmente (Rubinsky, 2003; Fuller, 2004). Es exitosa con oocitos y embriones animales, y cultivos celulares de plantas (Fuller, 2004).

3.3.2. Congelamiento lento

El congelamiento lento usa tasas de enfriamiento moderadas a lentas y, generalmente se realiza en cámaras de enfriamiento que llegan hasta -80°C (Arav *et al.*, 2002; Rubinsky, 2003). Aquí las células deben enfrentar los problemas osmóticos y estructurales antes descritos en enfriamiento, congelamiento y descongelamiento. Ya que el “estado vidrioso”

es difícil de alcanzar para la mayoría de soluciones y no todas las células de origen animal logran sobrevivir tasas de enfriamiento tan rápidas como las empleadas en la vitrificación, el congelamiento lento es el procedimiento más usado para criopreservar una variedad de células animales, sin incluir óvulos o embriones (Fuller, 2004).

3.3.3. Crioprotectores

En ambas técnicas, además de la solución salina base, se debe tener en cuenta los crioprotectores (CP) a usar, ya que con su adición se evitan los daños celulares, durante el proceso de enfriamiento, congelamiento y descongelamiento (Rubinsky, 2003). En la década de 1940 se reporta por primera vez la adición de glicerol para obtener mejores resultados en la criopreservación de semen de ave, a partir de entonces se investiga la acción crioprotectora de una serie de compuestos polialcohólicos (Arav *et al.*, 2002; Browne y Figiel, 2011).

Pero es a partir de 1965 que se usa el término “crioprotector” en la criobiología moderna, para definir cualquier sustancia que, añadida a la solución base, logre que sobrevivan más células al congelamiento/descongelamiento de lo que sobrevivirían sin éste (Fuller, 2004). Esta amplia definición hace que una variedad de compuestos orgánicos sean considerados CPs, entre los cuales podría hacerse una distinción principal entre compuestos coligativos y no coligativos (Fuller, 2004; Hill *et al.*, 2008).

Los compuestos coligativos bajan el punto de congelamiento de la solución, únicamente, incrementando su concentración (Hill *et al.*, 2008) pues, cómo se sabe, el punto de congelamiento de una solución está en relación inversa a la concentración de solutos en ella (Wolfe y Bryant, 1999), evitando que las sales aumenten hasta una concentración nociva mientras el resto del sistema llega al equilibrio térmico (Fuller, 2004).

Estos compuestos son ampliamente usados en laboratorio y podemos citar como los de mayor éxito en varios organismos a sacarosa, glicerol, 1,2-propanodiol, etanodiol y Dimetil Sulfóxido (DMSO). Otros compuestos de bajo peso molecular y de poca efectividad son aminoácidos, otros azúcares y amidas (Fuller, 2004). Algunos CPs que son permeables a la membrana, como el glicerol y el DMSO que a más de disminuir el punto de congelamiento de la solución, también pueden cumplir su rol reemplazando el volumen de agua que la célula pierde durante el proceso de enfriamiento (Hammerstedt *et al.*, 1990).

A más de su capacidad crioprotectora, debería tomarse en cuenta la toxicidad de estos compuestos ya que se ha visto que la sola exposición de células al CP puede causar la misma cantidad de daños que la criopreservación (Fuller, 2004).

El glicerol y la glucosa son los CPs coligativos que se encuentran en la naturaleza y son empleados por varios insectos y vertebrados poiquiloterms tolerantes al congelamiento (Lee y Costanzo, 1998). Como el ya mencionado *L. sylvaticus* que incrementando sus niveles de glucosa en la sangre hasta 300 $\mu\text{mol/g}$ (Costanzo y Lee, 1994). Otro anuro, *Hyla versicolor*, a más de la glucosa promueve la síntesis de glicerol como su principal CP, constituyendo el 30% de los solutos en el plasma sanguíneo, concentración que puede alcanzarse sólo por aclimatación a temperaturas bajas *L. sylvaticus* (Layne y Jones, 2001).

Los compuestos no coligativos también disminuyen el punto de congelamiento de la solución, pero por interacciones químicas específicas que evitan el crecimiento de cristales nacientes de hielo al pegarse a su superficie y cambiar la arreglada orientación de las moléculas de agua en estado sólido, así las moléculas de agua líquida no pueden unirse (Hill *et al.*, 2008; Pough *et al.*, 2005). Se encuentran en peces marinos polares, varios insectos, plantas, hongos y bacterias con gran capacidad de superenfriamiento (Pough *et al.*, 2005). Y si bien su uso en laboratorio sería de utilidad, controlar su actividad resultó

más complicado de lo que se creía debido a su mecanismo de acción, que reduce sólo el punto de congelamiento y no el punto de fusión, provocando histéresis (Fuller, 2004).

Ya que un CP debe actuar a varios niveles (como ya se describió en los daños celulares provocados por el enfriamientos, congelamiento y descongelamiento), es de esperarse que cada uno presente diferentes resultados en cada tipo celular, considerando además sus posibles efectos tóxicos (Fuller, 2004; Rubinsky, 2003; Hammerstedt *et al.*, 1990). Y, justamente por esto, puede ser que la elaboración de protocolos específicos continúe desarrollándose de manera empírica en anfibios, sin método sofisticado para predecir la efectividad de los tratamientos (Fuller, 2004, Sargent y Mohun, 2005).

En las dos últimas décadas se ha logrado recuperar la motilidad y capacidad de fertilización de espermatozoides después del congelamiento en algunas especies: *Bufo marinus* (Browne *et al.*, 1998), *Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis* (Sargent y Mohun, 2005), *Bufo americanus*, *L. sylvaticus*, *Rana pipiens* (Beesley *et al.*, 1998) y 6 hílidos australianos (Clulow *et al.*, 1999), algunos con altos porcentajes de fertilización.

En estos protocolos, las soluciones salinas base varían ligeramente en su composición, las tasas de enfriamiento mayormente usadas van de moderadas a lentas y como CPs se usan el DMSO y el glicerol, adicionados otros CPs impermeables a la membrana como yema de huevo o sacarosa (Browne *et al.*, 1998; Sargent y Mohun, 2005; Beesley *et al.*, 1998; Browne y Figiel, 2011).

3.3.4. Estructura general de los espermatozoides

Un protocolo adecuado para la criopreservación de espermatozoides debe proteger su estructura y funcionalidad de tal manera que puedan cumplir todos los procesos involucrados en la fertilización, lo cual implica mantener los receptores de membrana que reconocerán: 1. las proteínas difundibles, liberadas por la capa gelatinosa de los huevos,

que los llevarán a ellos mediante quimiotaxis e incrementando su motilidad (Al-Anzi y Chandler, 1998); 2. los azúcares específicos de la gelatina que iniciarán la reacción acrosomal (Gilbert, 2010); 3. las glicoproteínas que permitirán la unión del espermatozoide a la membrana vitelina (Tian *et al.*, 1997); y, 4. las proteínas capaces de promover la fusión activa de las membranas de ambos gametos (Gilbert, 2010).

El espermatozoide que ha ingresado al huevo, a más del material genético, aportará con su centriolo, el cual se divide en dos para formar los polos del huso mitótico y permitir el primer clivaje. Se cree que es el mismo contacto del espermatozoide con la membrana del huevo el responsable por la activación del metabolismo del cigoto en una cadena que empieza por la proteína G, continúa con la kinasa Src y una fosfolipasa C que libera Inositol 3-fosfato (IP3), que permite la apertura de las bombas de Ca^{2+} y con ello el incremento en su concentración, activando el huevo (Gilbert, 2010).

En la mayoría de las especies, los espermatozoides presentan tres partes: cabeza, cola y región media. La cabeza está formada por el núcleo, la vesícula acrosomal (proveniente del aparato de Golgi) y, en algunas especies, una capa de proteínas de actina que se encuentra entre éstos y que durante la fertilización formarán el proceso acrosomal (Gilbert, 2010). En anfibios la cabeza suele ser alargada y cilíndrica (Browne y Figiel, 2011) y, en la familia Bufonidae, en vez de la capa que formará el proceso acrosomal se encuentra una estructura llamada perforatorium, de mayor densidad que la vesícula acrosomal, y de función desconocida aunque es una sinapomorfía de la familia, ver Anexo 1 (Lee & Jamieson, 1993).

En la parte posterior de la cabeza suele estar un centriolo alrededor del cual se ubican los microtúbulos que formarán el axonema, éste constituye la parte principal del flagelo (Gilbert, 2010). En anfibios el axonema se ancla a dos centriolos y, en la mayoría, está

unido a una fibra axial accesoria mediante una membrana ondulatoria, pudiendo haber variaciones al respecto: dos flagelos simples o dos flagelos con membrana ondulatoria (Browne y Figiel, 2011).

La estructura del axonema es la misma de todos los linajes eucariotes (9 + 2): un núcleo central de dos microtúbulos rodeado de 9 duplas de microtúbulos. Si bien la tubulina es la proteína principal de la estructura de los flagelos, la dineína es la proteína asociada responsable de su motilidad. Ésta es una ATPasa que hidroliza el ATP y con ello libera la energía necesaria para deslizar las duplas de microtúbulos y hacer que el espermatozoide se doble y se desplace (Gilbert, 2010). El ATP necesario para la acción de la ATPasa es sintetizado por las varias mitocondrias ubicadas en la parte media del espermatozoide (Gilbert, 2010).

3.4. ORGANISMO DE ESTUDIO

La especie *Rhinella marina* es considerada un complejo de especies, se encuentra distribuida desde Texas en EE.UU. hasta las zonas tropicales del norte de Sudamérica, ha sido ampliamente introducida en algunas islas como Australia, Barbados, República Dominicana, Haití, Jamaica, Japón, Puerto Rico y Taiwan (Solís *et al.*, 2009). En Ecuador se encuentra a ambos lados de la cordillera de los Andes, en el lado occidental está en los bosques seco y deciduo de la costa, húmedo tropical del Chocó, piemontano, montano y en el matorral internandino; al lado oriental se encuentra en los bosques montano, piemontano y húmedo tropical amazónico (AmphibiaWebEcuador, 2013). Se trata de una especie nocturna capaz de vivir en una variedad de hábitats tanto húmedos como secos, aunque prefiere permanecer cerca de áreas intervenidas y con poblaciones humanas. Sus hábitos reproductivos no tienen muchos requerimientos, sus larvas son acuáticas y venenosas, y son capaces de tolerar altas temperaturas (Solís *et al.*, 2009).

En *Rhinella marina* la cola del espermatozoide mide 50 μm (Anexo 2) de largo, está anclada al cuerpo mediante la fibra paraxonemal, la cual inicia muy unida al axonema, posteriormente se diferencia la fibra axial de la fibra juxta-axonemal (unida al axonema), entre éstas se encuentra la membrana ondulatoria, que al final desaparece y se vuelve a formar la fibra paraxonemal y una porción del flagelo queda libre, ver Anexo 1 (Lee y Jamieson, 1993).

Las mitocondrias en esta especie son ovoides y se ubican en un collar alrededor de la primera porción del flagelo (Anexo 1). El collar de mitocondrias junto con la cabeza miden 18 μm de longitud como se muestra en el Anexo 2 (Lee y Jamieson, 1993).

En esta investigación se criopreservaron espermatozoides de *R. marina* a -80°C mediante una técnica de congelamiento lento y el uso del reactivo DMSO a tres concentraciones (5%, 10% y 15%), esperando que éste proteja los gametos masculinos de los daños producidos por el proceso de congelamiento y descongelamiento, también se determinó la concentración de DMSO más efectiva para esta función.

Los espermatozoides criopreservados fueron usados en fertilizaciones *in-vitro* para conocer qué tratamiento preservó la mayor cantidad de espermatozoides viables. Por otro lado, dados los reportes de toxicidad del DMSO como teratógeno en humanos (DMSO Organization, 2012) se controló el número de individuos que llegaron hasta la fase larvaria (estadio 21) como evidencia para su uso seguro en las fertilizaciones *in-vitro* de anuros, para ello se usó el Índice Dorsonaterior (IDA) para malformaciones de anuros.

4. METODOLOGÍA

4.1. COLECCIÓN Y MANUTENCIÓN DE INDIVIDUOS

Se colectaron seis machos adultos de *R. marina* en la localidad de Canoa en la provincia de Manabí. Las hembras provenían de otras localidades de la Costa, una se colectó en Jama (Manabí), y otra, en Dos Mangas (Sta. Elena). Todos se colectaron entre enero y febrero del 2013, durante la época lluviosa. Una vez en el laboratorio, los individuos se mantuvieron juntos en un terrario plástico grande (68.5 cm x 35.4 cm x 7.1 cm) con malla plástica suspendida a 5 cm de la base del terrario (para evitar infecciones), además de dos recipientes con agua reposada. Se aclimataron durante una semana con una dieta a base de grillos y limpieza de los recipientes con agua de 3 veces por semana.

4.2. SOLUCIONES

Para la cirugía se usó como anestésico una solución de MS-222 al 0.5% (Wright, 2001), y para el proceso de recuperación se usó la solución salina SAR (Whitaker, 2001).

- MS-222 (Tricaina Metanosulfonato) 0,5% pH

0.5g MS-222

100ml Agua desstilada

pH = 7

- SAR (Solución de Ringer para Anfibios)

110mM NaCl

2mM KCl

1.3mM CaCl₂

2.4mM NaHCO_3

Para los tratamientos de criopreservación se usó como solución salina base la solución SB, empleada para los espermatozoides de *Rana sylvatica*, *R. pipiens* y *Bufo americanus* (Beesley *et al.*, 1998) adicionada HEPES hasta una concentración de 2.5mM, usado para controlar los desechos de la respiración y mantener el pH en soluciones de espermatozoides de *X. laevis* (Al-Anzi y Chandler, 1998).

- SB: 104.4mM NaCl

2.0mM KCl

6.1mM Na_2HPO_4

1.0mM KH_2PO_4

pH = 7.4

A la solución SB con HEPES 2.5mM se le adicionó el DMSO a la concentración necesaria: 5%, 10% o 15%.

4.3. COLECCIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS MASCULINOS

Se orquidectomizó parcialmente a los individuos, retirando un testículo completo y la mitad del otro para la aplicación de tres tratamientos (una mitad correspondiente a cada uno), los tejidos se mantuvieron en solución SB con HEPES en hielo, hasta la criopreservación. Para la cirugía se utilizó el anestésico MS-222 en concentración 1%. Los individuos parcialmente orquidectomizados fueron suturados con hilo Vycril 3-0 y pasados a un terrario individual que tenía la solución SAR para su recuperación. Una semana después se volvió a operar a los individuos para remover la mitad restante de uno de los testículos, ya que esta porción correspondió al tratamiento control (sin

congelamiento) para las fertilizaciones *in-vitro* y la revisión del estado de la membrana plasmática.

Cada mitad de testículo extraída en la primera cirugía se pesó y colocó en un tubo de microcentrífuga que contenía 1 ml de la solución base adicionada DMSO a la concentración requerida (5%, 10% o 15%). El tejido se cortó en varios pedazos, la solución resultante se pasó a viales que contenían 1ml de la solución correspondiente, se dejó incubar esta mezcla durante 5 minutos. Finalmente, se repartió esta solución de espermatozoides en seis alícuotas de 250 μ l. Las muestras se mantuvieron a 4°C durante 10 minutos y a -20°C por 1 hora, al cabo de la cual pasaron a la ultracongeladora de -80°C, donde permanecieron por una semana o seis meses.

4.4. DESCONGELAMIENTO Y REVISIÓN DE DAÑOS EN LOS ESPERMATOZOIDES

Transcurrida una semana y seis meses de la colocación de las muestras a -80°C, se descongeló una de las alícuotas de cada tratamiento a temperatura ambiente (20°C). Se realizó un recuento de espermatozoides tanto de las muestras descongeladas, como de las muestras control mediante una cámara de recuento de Neubauer mejorada (1/400 mm², 1/10 mm de profundidad) de la marca Propper Lumicyte.

Ya que no se pudo realizar fertilizaciones *in-vitro* con las muestras descongeladas a los seis meses, se utilizaron dos tintes fluorescentes para conocer la integridad de las membranas. Se tomó 30 μ l de solución de espermatozoides y se le colocó 10 μ l del tinte Propidium Iodide (PI) 1 μ M durante 15 minutos, luego se añadió 0,5 μ l del tinte Hoescht 1,6 mM por 10 minutos, la incubación de ambos tintes fue a temperatura ambiente. PI es un tinte completamente impermeable a la membrana, por lo que sólo puede pasar a través de membranas dañadas (Beesley *et al.*, 1998), por otro lado, Hoescht es un tinte permeable a

las membranas y es capaz de pasar células con membranas intactas, de tal manera que PI ingrese a las células muertas y, Hoescht, a las vivas. Como un control del funcionamiento adecuado de ambos tintes, se obtuvo una muestra fresca de espermatozoides en solución SB con HEPES, provenientes de un macho fuera del grupo de estudio, pues aquellos fueron sacrificados para la prueba de fertilidad de los espermatozoides descongelados a la semana.

Para las placas se utilizó 15ul de la solución con los tintes y se las llevó, inmediatamente, al Microscopio de Fluorescencia Olympus Bx54 con cámara DP72, para realizar 3 micrografías de cada placa: una con el filtro FITC (rango de excitación: 450 – 490nm) para ver las células muertas teñidas con PI (rojo), otra con el filtro DAPI (excitación: 365nm) para visualizar las células vivas (azul) y una con luz normal para controlar que entre ambos tintes se logre el número total de espermatozoides. Posteriormente las micrografías fueron editadas con el programa Photoshop v8.

En las micrografías del tratamiento control se tomaron las medidas del cuerpo y la cola de los espermatozoides mediante el programa Cell*F versión 2.4.112-240608 de Olympus.

4.5. FUNCIONALIDAD DE ESPERMATOZOIDEOS EN FERTILIZACIONES *IN-VITRO*

Para conocer la capacidad de fertilización de los espermatozoides, se descongelaron después de una semana, dos alícuotas de cada tratamiento. Una se descongeló a temperatura ambiente, y otra, a 4°C, donde permaneció por una hora antes de realizar la fertilización *in-vitro*. Para cada alícuota se usaron los huevos de una hembra diferente. Los huevos se obtuvieron mediante inducción hormonal con macerados de pituitarias frescas de hembras de la misma especie. Se colocaron hileras de huevos de 10 cm en cajas Petri, en cada una se adicionaron 100 µl de una de las soluciones de espermatozoides, al cabo de un minuto, las cajas Petri se llenaron con agua filtrada. Se calculó un porcentaje

de fertilización por cada caja Petri, contando los embriones en gástrula temprana (Bautista, 2012) como fertilizaciones exitosas.

4.6. EFECTO DEL DMSO EN EL DESARROLLO DE LOS EMBRIONES

Los embriones se mantuvieron hasta que llegaron a su etapa larvaria en cajas Petri de 90.2cm de diámetro, sin tapa y llenas de agua reposada. Se usó la tabla del desarrollo de *R. marina* (Bautista, 2012) para conocer si los embriones obtenidos siguieron un desarrollo normal (Anexo 3). Se tomaron fotografías de los embriones y las malformaciones encontradas fueron comparadas con las descritas en el Índice Dorsoanterior (IDA) para *Xenopus laevis* (Anexo 4). Este índice va del 0 al 10, donde el 5 representa el embrión normal, los inferiores se caracterizan por la pérdida de estructuras dorso-anteriores, y los superiores, por la presencia excesiva de estas estructuras (Sive *et al.*, 2000).

También se mantuvieron unas cuantas larvas hasta su desarrollo en metamorfos para conocer si lograban completar el proceso, más no se crió a todas hasta este estado por limitaciones con el espacio, la manutención y el hecho de que su muerte podría ser explicada por otros factores como la alimentación, y no necesariamente por efectos del DMSO.

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizó un Análisis de Varianzas (ANOVA) con el programa SPSS 20. Los tratamientos fueron 4: tres tratamientos de espermatozoides congelados/descongelados, cada uno con una concentración de DMSO (5%, 10% y 15%); y un tratamiento control que consistió en espermatozoides extraídos el día de la fertilización *in-vitro*, que no fueron congelados/descongelados, ni adicionados DMSO.

El ANOVA se realizó mediante el Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA), ya que éste permite eliminar la variancia entre individuos y poder determinar:

- a.* Si el proceso de congelamiento/descongelamiento tuvo efectos en la concentración de espermatozoides y si las concentraciones de DMSO evitaron estos daños.
- b.* El mejor tratamiento de DMSO para proteger la funcionalidad de los espermatozoides y lograr fertilizaciones exitosas.
- c.* La tasa de enfriamiento que conserve la funcionalidad de una mayor cantidad de espermatozoides capaces de fertilizar.
- d.* La influencia de la concentración de DMSO en el porcentaje de malformaciones, este análisis sólo pudo ser realizado con las larvas obtenidas con espermatozoides descongelados a 4°C.

Cuando los datos no cumplieron con los requisitos del ANOVA, éstos fueron transformados a la función (logarítmica o arcoseno) que sí se ajustara a los requerimientos del ANOVA. Los subgrupos se compararon mediante la prueba de rango múltiple de Duncan.

Para comparar la concentración de espermatozoides descongelados a la semana con los descongelados a los 6 meses, se aplicó la prueba de Wilcoxon (de rangos con signo) ya que se trata de muestras dependientes con sólo seis pares de datos. La cantidad de rangos positivos y negativos obtenidos se comparan con los valores críticos de la prueba de Wilcoxon para obtener la significación.

5. RESULTADOS

5.1. EFECTOS DEL CONGELAMIENTO Y DE LOS TRATAMIENTOS EN LA ESTRUCTURA Y CONCENTRACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Con luz visible, las muestras descongeladas luego de una semana y de seis meses presentaron cambios en varios espermatozoides. Algunos mostraban daños severos en la superficie de la membrana plasmática, ésta se volvió irregular y, en ciertos puntos, parecía discontinua (Fig. 1).

Para las muestras procesadas a los seis meses (en las que se usaron los tintes), se realizó un control con espermatozoides frescos (extraídos ese día en SB) provenientes de un macho aparte de los usados para el congelamiento. Este control permitió ver los espermatozoides vivos teñidos con Hoescht y, los muertos, con PI a través de los filtros DAPI y FITC (Fig. 2), ningún espermatozoide teñido de rojo tenía motilidad, los teñidos de azul sí presentaban algún tipo de motilidad. En las muestras descongeladas a los seis meses, además de las lesiones visibles en el microscopio normal (Fig. 1), la luz fluorescente reveló que los espermatozoides en todos los tratamientos sólo estaban teñidos con el tinte PI (Fig. 3).

La concentración de espermatozoides, para las muestras descongeladas a la semana, fue menor de manera altamente significativa ($p = 0.007$, $gl = 15$, $F = 4.77$) en todos los tratamientos sometidos al congelamiento/descongelamiento, en comparación con el tratamiento control, que tuvo una concentración (media \pm desviación estándar) de $2.29 \pm 1.49 \times 10^7$ espermatozoides/ml (Tabla 1, Fig. 4). El análisis post-hoc evidenció que de las soluciones crioprotectoras, las de DMSO al 10% y 15% ($p = 0.36$) mantuvieron una mayor concentración de espermatozoides, $1.15 \pm 0.86 \times 10^7$ y 0.94 ± 0.79

espermatozoides/ml, respectivamente (Tabla 1, Fig. 4). Para el ANOVA los datos fueron transformados a logaritmo ya que no cumplían con homogeneidad de variancias (Anexo 5).

En las muestras descongeladas a los seis meses se vio la misma tendencia (Fig. 5), con una significación $p = 0.008$ ($gl = 15$, $F = 6.15$). La concentración de espermatozoides (media \pm desviación estándar) más alta se dio con los tratamientos DMSO al 10% y al 15%: $1.39 \pm 1.32 \times 10^7$ y $1,17 \pm 1,01$ espermatozoides/ml, respectivamente. Según los análisis post-hoc, hubo diferencias entre estos tratamientos ($p = 0.54$), pero sí con el tratamiento DMSO 5% (Tabla 2). Cuando las concentraciones de espermatozoides descongelados a la semana y a los 6 meses se compararon mediante la prueba de Wilcoxon, no se encontraron diferencias significativas en ningún tratamiento (Tabla 3).

Las medidas del cuerpo (cabeza y collar de mitocondrias) y la cola tomadas en las micrografías de los espermatozoides del tratamiento control indicaron que la primera parte midió en promedio $47.2\mu\text{m}$, mientras que la segunda, $90.31\mu\text{m}$ (Fig. 6).

5.2. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS EN LA FUNCIONALIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDEOS

Espermatozoides descongelados a temperatura ambiente. Las fertilizaciones logradas por los espermatozoides del tratamiento control tuvieron una media de $91.28 \pm 7.58\%$, siendo diferentes de manera altamente significativa a las medias del resto de tratamientos ($p < 0.0001$, $gl = 15$, $F = 93.97$). Entre los tratamientos de DMSO no se encontraron diferencias mediante los análisis post-hoc (Tabla 4, Fig. 7). Para el análisis se transformaron los datos a función arcoseno ya que no contaban con homogeneidad de varianza, ni normalidad (Anexo 6).

Espermatozoides descongelados a 4°C . De igual manera, el porcentaje de fertilización de los tratamientos congelados/descongelados fue significativamente inferior ($p < 0.0001$, gl

= 15, $F = 20.94$) a la media del control (Tabla 5). Los análisis post-hoc tampoco indicaron diferencias entre los tratamientos de DMSO sometidos a congelamiento/descongelamiento (Tabla 5, Fig. 8).

En cuanto al efecto de la tasa de descongelamiento, la media en el porcentaje de fertilización de todos los tratamientos de DMSO fue mayor cuando los espermatozoides se descongelaron a 4° que a temperatura ambiente ($p = 0.02$, $gl = 40$, $F = 5.82$), con los porcentajes (media \pm desviación estándar) $35.9 \pm 2.67\%$ y $26.93 \pm 2.62\%$, respectivamente. Ver figura 9.

5.3. EFECTO DEL DMSO EN EL DESARROLLO DE LOS EMBRIONES

El análisis estadístico sólo pudo realizarse con las larvas obtenidas con los espermatozoides descongelados a 4°C, ya que la mayoría de embriones provenientes de espermatozoides descongelados a temperatura ambiente murieron, quedando para al menos 2 tratamientos sólo una repetición.

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0.015$, $gl = 15$, $F = 8.25$). Según los análisis post-hoc, tratamiento control y el de DMSO al 10% representan un subgrupo ($p = 0.1$) con los menores porcentajes (media \pm desviación estándar) de individuos malformados, $8 \pm 3.74\%$ y $10.43 \pm 4.64\%$ (Tabla 6). Mientras que el tratamiento de DMSO al 15% tiene un 10% más de larvas mal formadas que el control, formando un subgrupo aparte según los análisis post-hoc (Tabla 6, Fig. 10). Los datos empleados en este análisis fueron transformados a logaritmo de base diez, ya que no cumplían con homogeneidad de varianzas (Anexo 7).

Ya que los porcentajes de fertilización logrados con estos ensayos en general son bajos (Tablas 4 y 5), el número de embriones en la mayoría de casos no llegó al estadio 20. Así

que el porcentaje de sobrevivientes y el tipo de malformaciones encontradas no fueron sometidos a análisis estadísticos.

Al comparar los tiempos de desarrollo de los embriones obtenidos con la Tabla de Desarrollo de *R. marina* (Bautista, 2012) no se encontraron diferencias en los tiempos de desarrollo, ni en las características externas. En los embriones de la fertilización con espermatozoides descongelados a 4°C, en el estadio 19 (a los 7 días), cuando el cuerpo de la cola desarrolla las glándulas de cemento (Bautista, 2012), hubo un 2.19% de individuos con malformaciones de tipo 2, 7 y 8 (Fig. 11, Tabla 7) y un 2.23% de larvas con reducción, únicamente, en el tamaño de la cola (Fig. 12). En el estadio 21 (a los 11 días), cuando las branquias se externalizan (Bautista, 2012), hubo un 3.63% de larvas con malformación de tipo 6 (Fig. 13B) y, un 2.23%, con edema en el lado ventral (Fig. 13A, Tabla 7).

En los embriones de fertilizaciones con espermatozoides descongelados a temperatura ambiente, en el estadio 19 sólo se identificó un 5.59% de larvas con reducción en el tamaño de la cola. Y, en el estadio 21, un 5.59% con malformación de tipo 6.

El tratamiento control también presentó malformaciones: en el estadio 19 hubo un 2.05% de especímenes con malformaciones de tipo 7 y 8, y un 3.95% que presentaban reducción en el tamaño de la cola. En el estadio 21 se encontró un 2.63% de larvas con malformación de tipo 6, y un 0.11% con edema (Tabla 7).

Ningún individuo con estas malformaciones pasaron del estadio 25, donde el opérculo cubre las branquias (Bautista, 2012), a excepción de los que presentaron disminución en el tamaño de la cola, los cuales pudieron continuar su desarrollo, aparentemente sin repercusiones.

Adicionalmente, se fijaron 22 metamorfos de diferentes tratamientos, 11 de cada fertilización (espermatozoides descongelados a 4°C y a temperatura ambiente). 12

corresponden al tratamiento DMSO al 5%; 2, al DMSO 10%; y 8 al DMSO 15% (Tabla 8). El primer metamorfo se obtuvo a los 54 días a partir de la fertilización. En ninguno de estos metamorfos se encontró algún tipo de malformación o anomalía, todos poseían su cabeza y sus extremidades completas. Se vio que varios fueron capaces de alimentarse.

6. DISCUSIÓN

La disminución en la concentración de espermatozoides frente al control, tanto en los espermatozoides descongelados a la semana, como en los descongelados a los 6 meses (Figs. 4 y 5), indica que hubo lisis celular durante el proceso de congelamiento/descongelamiento, esto podría deberse al modo en que se congelaron las muestras, pues al permanecer por 20 minutos a -20°C debieron superenfriarse a esta temperatura y, con su paso a -80°C , la presencia de hielo en la ultracongeladora pudo haber iniciado un congelamiento extremadamente rápido que promovió la formación de hielo intracelular (Lee y Costanzo, 1998).

Aparte de la lisis celular, hubo daños evidentes en la estructura de los espermatozoides, de los cuales el más conspicuo fue el rompimiento de la membrana plasmática, como se ve en las micrografías con luz normal y fluorescente (Fig. 1, C y D). Además de esta notable diferencia frente a los espermatozoides sanos, los espermatozoides descongelados a los seis meses con forma normal, pero teñidos con PI (Fig. 3) nos permiten inferir que hubo otro tipo de cambio en la membrana plasmática que disminuyó su permeabilidad y mató a los espermatozoides, en respaldo a esto, no hubo motilidad alguna en ninguno de los espermatozoides.

La transición de los lípidos de disposición bicapa a fase hexagonal II (no detectable a simple vista) podría ser la causante de esto, pues esta nueva disposición es la responsable de la pérdida de fluidez en la membrana y del incremento en su permeabilidad (Wolfe y Bryant, 1999). Como consecuencia de la pérdida de fluidez, también puede haber un reordenamiento de los componentes proteicos (Hammerstedt *et al.*, 1990) incrementado las deficiencias en el transporte normal de sustancias a través de la membrana.

A pesar de la notable pérdida de espermatozoides en todos los tratamientos de congelamiento/descongelamiento, podemos decir que hubo los suficientes para lograr varias fertilizaciones exitosas, comprobando el papel crioprotector del DMSO en los espermatozoides de *R. marina*, seguramente, bajando el punto de congelamiento de la solución (Hill *et al.*, 2008) gracias a su carácter altamente hidrofílico que lo hace capaz de formar puentes de hidrógeno con el agua. Además que, al reducirse el volumen del agua (por el congelamiento), el DMSO también puede interactuar con los fosfolípidos de la bicapa y mantener su estado fluido (Sum y Pablo, 2003).

La concentración de DMSO al 10% es más efectiva que la de 5% en reducir la lisis celular en espermatozoides congelados/descongelados (Fig. 4 y 5), a diferencia del ensayo realizado por Browne y colegas con la misma especie en Australia, donde la concentración más alta fue la más exitosa. Sin embargo, estos resultados no pueden ser comparables porque la técnica de congelamiento fue diferente, el otro estudio usó una cámara de enfriamiento en la que se puede regular la tasa de congelamiento, lo cual influye en todos los aspectos del proceso.

Sabiendo que *R. marina* es un complejo de especies de amplia distribución geográfica, la diferencia en las medidas obtenidas de los espermatozoides en este estudio con las medidas resultantes del estudio de Lee y Jamieson sobre la estructura del espermatozoide en la misma especie, donde la cabeza del espermatozoide mide 18 μ m y, la cola, 50 μ m (Anexo 2), podrían indicarnos que los individuos ecuatorianos provenientes de la localidad de Canoa (Manabí), en los que la cabeza del espermatozoide mide 47.2 μ m, y la cola, 90.31 μ m (Fig. 6), son una especie diferente a la encontrada en Australia.

De ser de esta manera, los desacuerdos en resultados de este estudio frente al realizado por Browne y colegas en la supuesta misma especie (Browne *et al.*, 1998), tendrían su origen

en que se trata de poblaciones diferentes, sugiriendo incluso, que se trate de especies diferente. Sin embargo, deberían tomarse más medidas de espermatozoides y con una técnica similar a la usada en el estudio de Lee y Jamieson en 1993, donde el tejido fue fijado y examinado en un microscopio de barrido electrónico.

Otro dato importante es que la concentración de espermatozoides permanece constante sin importar el tiempo que permanezca a -80°C , ya que no se encontraron diferencias significativas entre las muestras descongeladas a la semana y a los 6 meses (Tabla 3) como se esperaba, pues se plantea que el tiempo de permanencia de las muestras no debería influir en ningún aspecto una vez que las células sobrevivieron al proceso de congelamiento y descongelamiento (Hammerstedt *et al.*, 1990). Aunque, el ingreso del tinte PI en todos los espermatozoides indicaría muerte celular, corroborando el efecto protector del DMSO sobre la estructura de los espermatozoides, pero no en su funcionalidad.

En relación a los porcentajes de fertilización, primero se encuentran diferencias significativas entre la capacidad de fertilización de los espermatozoides descongelados a temperatura ambiente, frente a los descongelados a 4°C (Fig. 9) que, incluso, fueron mantenidos a esa temperatura por una hora antes de ser usados. En la mayoría de artículos referentes a criopreservación se recomienda el descongelamiento a temperatura ambiente a altas temperaturas como 30°C (Sargent y Mohun, 2005), en *R. marina* de Australia se descongelaron a 21°C (Browne *et al.*, 1998), similar a la temperatura ambiente del laboratorio (20°C).

Con estas temperaturas de descongelamiento se propicia una tasa de enfriamiento rápida que evitarían los daños por recristalización o desequilibrio osmótico (Hammerstedt *et al.*, 1990), como la desintegración del cuerpo o la dislocación de flagelos (Browne *et al.*,

1998). Pero, el descongelamiento a temperatura ambiente en este ensayo (20°C) produjo, en todos los tratamientos, menores porcentajes de fertilización (Fig. 9).

Las diferentes concentraciones de DMSO no tuvieron diferencias significativas entre sí en los porcentajes de fertilización alcanzados (Figs. 7 y 8), aunque sí hubo diferencias significativas en la concentración de espermatozoides entre las concentraciones de DMSO del 10% y 5%. Esto nos indica que no todos los espermatozoides sobrevivientes a los daños estructurales pudieron preservar su funcionalidad, como se ven en la Figura 7, concentraciones similares de espermatozoides no produjeron la misma cantidad de fertilizaciones, habiendo un control con concentración menor a 1×10^7 espermatozoides/ml que alcanzó mayor porcentaje de fertilización que los congelados/descongelados de mayor concentración.

Como ya se indicó antes, el enfriamiento de por sí tiene efectos perjudiciales sobre las membranas, pues el descenso de temperatura disminuye la actividad de las bombas iónicas y provoca un incremento en la concentración de Na^+ , K^+ , ATPasa, Mg^{++} y Ca^{++} (Hammerstedt *et al.*, 1990). Si el estado de superenfriamiento fue, en efecto, muy prolongado, en esos 20 minutos a -20°C, la concentración de ATPasa pudo haberse incrementado lo suficiente para acabar con el ATP de las células y causar la deficiencia en actividad mitocondrial, incluso antes de que la parte acuosa del sistema llegue a congelarse a -80°C, lo que implicaría una falla desde el inicio del proceso.

El DMSO parece tener un efecto positivo en la parte estructural de los gametos masculinos, evitando los daños en las membranas. Pero, por otro lado, la facilidad que el DMSO tiene para acumularse en las bicapas lipídicas, que se incrementa proporcionalmente con la temperatura, hace que éste se vuelva nocivo (Sum y Pablo, 2003), incluso, se ha reportado toxicidad de este reactivo en oocitos de mamíferos (Fuller,

2004). Sin embargo, en los gametos masculinos de anuro no causa daños a las concentraciones usadas (2 – 20%), como el caso de la *R. marina* australiana, cuyos espermatozoides no presentaron daños con una hora de exposición al reactivo (Browne *et al.*, 1998), al igual que los pertenecientes a nuestra *R. marina*.

Además este reactivo ha sido usado para criopreservar los espermatozoides de todas las especies de anuros hasta ahora estudiadas sin presentar problemas de toxicidad (Browne *et al.*, 1998; Beesley *et al.*, 1998; Clulow *et al.*, 1999), a excepción de *Xenopus laevis* y *X. tropicalis*, donde este reactivo no es efectivo, pero tampoco es tóxico (Sargent y Mohun, 2005).

Por tanto, los efectos tóxicos del DMSO no podrían ser los responsables por las bajas tasas de fertilización, aunque sí podría estar involucrado en ello de diferente manera. Como lo reportado para el espermatozoide del pez *Morone saxatilis*, donde el incremento en la concentración de DMSO mantiene íntegras una mayor cantidad de membranas, pero reduce el contenido de ATP y la función mitocondrial (He y Woods III, 2004), que concuerda con la activación de la síntesis de ATP con DMSO al 15% en membranas de sarcoplasma (The y Hasselbach, 1977). En este estudio, el tratamiento que presenta el menor porcentaje de fertilización sin ser el de menor concentración de espermatozoides es, justamente, el que usa DMSO al 15%.

Como los porcentajes de fertilización parecen estar más influenciados por la actividad mitocondrial que por la concentración de espermatozoides, puede ser que el descongelamiento a 4°C mantuvo una baja tasa metabólica y evitó que se gastara todo el ATP, logrando así el incremento en los porcentajes de fertilización de este tratamiento (Fig. 9).

Finalmente, en lo referente a los embriones obtenidos, las malformaciones están presentes en todos los tratamientos, incluido el control, donde representan un 4.7% (Fig. 10). En las poblaciones naturales de anfibios existe un 2% de individuos con anormalidades (Pášková *et al.*, 2011), lo cual podría identificarse con el porcentaje obtenido en este ensayo. Como puede verse en la figura 11, este porcentaje incrementa en los tratamientos sometidos a congelamiento/descongelamiento, con un 8.65% de especímenes anormales en la fertilización con espermatozoides descongelados a 4°C y, un 5.6% en la proveniente del espermatozoides descongelados a temperatura ambiente (Tabla 7).

Las malformaciones determinadas de manera externa según el IDA (Anexo 4) corresponden a irregularidades en la formación de ejes del embrión, que pueden ser inducidas desde el primer clivaje hasta estadios avanzados como el cuerpo de la cola, y ser identificadas desde la gástrula temprana (Sive *et al.*, 2000). La malformación más abundante, tanto en controles como en los otros tratamientos, fue la de tipo 6 que implica un doblamiento del eje, las malformaciones más severas en las que hay carencia de estructuras dorsales o ventrales como los tipos 2, 7 y 8 no fueron tan abundantes (Tabla 7).

Estas anormalidades se producen por problemas en la señalización temprana, como en las vías β -catenina o Kinasa glicógeno sintasa - 3β (GSK- 3β) para la dorsalización del embrión (Sive *et al.*, 2000). Existen varios factores naturales capaces de producir malformaciones como la luz UV excesiva o pH extremos (Pášková *et al.*, 2011), de entre estos factores la concentración de amonio en el medio puede alterar vías de señalización en embriones de salmónidos, perjudicando las comunicaciones célula-célula y produciendo daños en el tejido nervioso. Las altas concentraciones de amonio también aumentan la formación de NO y disminuyen la síntesis de ATP (Finn, 2007).

Otros factores influyentes en las anormalidades de embriones son las Especies Reactivas de Oxígeno, de las cuales ya se mencionó que, si bien son señalizadoras importantes en algunos procesos (D'Autréaux y Toledano, 2007), entre ellos el transcurso normal del clivaje, pueden causar anormalidades en los embriones si no se controla efectivamente su concentración. En estadios tempranos de algunas larvas acuáticas la concentración de antioxidantes aumenta y puede mantenerse hasta que terminen la metamorfosis, sugiriendo que necesitan protección de estos radicales de oxígeno (Pášková *et al.*, 2011).

El DMSO demuestra tener acciones antioxidantes frente al radical hidroxilo, una de las especies reactivas de oxígeno más abundantes y nocivas (Chetverikova, 2012), explicando porque no existen diferencias significativas entre los tratamientos de DMSO al 5 y 10% frente al control (Fig. 10). Por otro lado, la evidencia antes mencionada, sobre los efectos nocivos en los microtúbulos de oocitos de mamíferos, podría haber afectado el proceso de rotación cortical (determinante del lado dorsal) que depende de estas estructuras (Sive *et al.*, 2000), pero al parecer debería estar en concentraciones más altas, como el tratamiento de 15% DMSO que presentó diferencias significativas respecto al control (Fig. 10).

Considerando que el análisis estadístico, únicamente, fue realizado para el tratamiento de descongelamiento a 4°C por ser el que presentaba un N mayor, que en ambos tipos de descongelamiento hubo un N muy reducido frente al control (debido a las bajas tasas de fertilización en ambos casos), y que las anormalidades podrían ser causadas por altas concentraciones de amonio u otros elementos producidos por los mismos embriones, los resultados referentes al efecto del DMSO en las malformaciones de los embriones hasta el estadio 21, no podrían considerarse del todo concluyentes.

Los 22 metamorfos obtenidos, si bien no son un número considerable en relación con el total de los embriones fertilizados, pueden indicarnos, que una vez pasados los estadios

iniciales del desarrollo, los sobrevivientes pueden desarrollarse normalmente hasta ranas juveniles normales. Lo cual podría dar un referente sobre la calidad del material genético proveniente de espermatozoides congelados por una semana a -80°C con DMSO. Como ya se dijo antes, este reactivo es un eficaz antioxidante y, gracias a ello, parece evitar los daños al ADN (Chetverikova, 2012), por lo que lo más seguro es que las reducidas tasas de fertilización se deban al agotamiento de ATP antes discutido.

En este punto, sabiendo la variedad de daños que los radicales libres pueden causar y la importancia de los antioxidantes, pues su suplementación reduce la concentración de las especies reactivas de oxígeno y los daños al ADN (Chetverikova, 2012), a más del DMSO, la solución base contenía HEPES, el cual es comúnmente usado para la criopreservación de espermatozoides humanos, justamente por su función antioxidante (Devireddy *et al*, 2000; Agarwal *et al*, 2006). Si bien deberían hacerse más pruebas al respecto, exclusivamente en anuros, se puede recomendar su uso en la criopreservación de espermatozoides de este grupo.

El presente estudio permitió validar y ampliar el conocimiento sobre ciertos aspectos de la criogenia de espermatozoides de anuros y sobre el uso del DMSO. Se confirmaron los efectos protectores del DMSO sobre la membrana plasmática de los espermatozoides de *R. marina* sometidos a un proceso de congelamiento y descongelamiento, aunque éste podría activarlos prematuramente y, en consecuencia, reducir su capacidad de fertilización una vez descongelados. La concentración de DMSO al 10% fue la más efectiva en preservar la estructura de los espermatozoides. Todas las concentraciones de DMSO mantuvieron una capacidad de fertilización similar. También deberían hacerse más pruebas sobre la importancia del uso de HEPES como antioxidante protector del material genético en los espermatozoides de anuros.

Ya que la tasa de congelamiento usada en este experimento no fue la óptima y es, probablemente, la responsable de la mayor cantidad de lisis celular y de la reducción de actividad mitocondrial, se debería probar una tasa de enfriamiento más uniforme y moderada. Por otro lado, la tasa de descongelamiento (resultante de colocar las muestras a 4°C) empleada en este estudio resulta más efectiva que la usualmente empleada con otras especies de anuros.

Los embriones de *R. marina* obtenidos mediante fertilización *in-vitro* y mantenidos en laboratorio pueden presentar un 8% de especímenes malformados hasta la estadio 21 sin la adición de químico alguno o la realización de algún tipo de tratamiento especial. Pudiendo desarrollarse con normalidad hasta metamorfos bajo condiciones óptimas que eviten el estrés osmótico o cambios extremos de pH. Si se logra mantener la funcionalidad de una mayor cantidad de espermatozoides se obtendrían más embriones fertilizados y, con esta población más grande, evaluar de manera más concluyente el efecto del DMSO en el desarrollo normal de los embriones.

7. LITERATURA CITADA

Agarwal, A., Gupta, S., Sikka, S. 2006. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 18: 325-332.

Al-Anzi, B. y Chandler, D. 1998. A sperm chemoattractant is released from *Xenopus* egg jelly during spawning. *Developmental Biology* 198: 366-375.

AmphibiaWeb. 2009. Worldwide Amphibian Declines: How big is the problem, what are the causes and what can be done? En AmphibiaWeb org. Disponible en: <<http://amphibiaweb.org/declines/declines.html>> [Consultado: Enero del 2013].

Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., Gacitua, H. 2002. New trends in gamete's cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 187: 77-81.

Bautista, G. 2012. Fertilización *in vitro*, morfología parcial externa de embriones y larvas de *Rhinella marina* (Anura: Bufonidae) y ovulación en *Chiasmocleis bassleri* (Anura: Microhylidae). Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Beesley, S., Costanzo, J., Lee, R. 1998. Cryopreservation of spermatozoa from freeze-tolerant and intolerant anurans. *Cryobiology* 37: 155-162.

Bolaños, F., Castro, F., Cortez, C., De la Riva, I., Grant, T., Hedges, B., Heyer, R., Ibáñez, R., La Marca, E., Lavilla, E., Leite Silvano, D., Lötters, S., Parra Olea, G., Reichle, S., Reynolds, R., Rodríguez, L., Santos Barrera, G., Scott, N., Ubeda, C., Veloso, A., Wilkinson, M., Young, B. 2008. Amphibians of the Neotropical Realm. En: *Threatened Amphibians of the World*. Primera edición (Stuart, S.N., Hoffmann, M., Chanson, J.S., Cox, N.A., Berridge, R.J., Ramani, P., Young, B.E. eds.) pp. 92 – 105. Lynx Edicions, Barcelona, España.

Browne, R., Clulow, J., Mahony, M., Clark, A. 1998. Successful recovery of motility and fertility of cryopreserved Cane toad (*Bufo marinus*) sperm. *Cryobiology* 37: 339-345.

Browne, R. y Figiel, C. 2011. Amphibian conservation and cryopreservation of sperm, cells, and tissues. En: *Cryopreservation in aquatic species*. Segunda edición. World Aquaculture Society. Louisiana, EE.UU.

Browne, R., Wolfram, K., García, G., Bagaturaw, M., Pereboom, Z. 2011. Zoo-based amphibian research and conservation breeding programs. *Amphibian and Reptile Conservation* 5(3):1-14.

Chetverikova, E. 2012. DNA damage by reactive oxygen species in cryopreservation and the antioxidant properties of cryoprotectors. *Biophysics* 57(2): 263-269.

Clark, D., Durell, S., Maloy, L., Zasloff, M. 1994. Ranalexin: a novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. *Journal of Biological Chemistry* 264(14): 10849-10855.

Clulow, J., Mahony, M., Browne, R., Pomeroy, M., Clark, A. 1999. Applications of assisted reproductive technologies (ART) to endangered anuran amphibians. En: *Declines and Disappearances of Australian Frogs* (Biodiversity Group, eds) pp. 219-225. Environment Australia, Canberra, Australia.

Costanzo, J y Lee, R. 1994. Biophysical and physiological responses promoting freeze tolerance in Vertebrates. *National Institute for Physiological Science* 9: 252-256.

Costanzo, J., Lee, R., Lortz, P. 1993. Physiological responses of freeze-tolerant and intolerant frogs: clues to evolution of anuran freeze tolerance. *The American Journal of Physiology* 265: 721-725

D'Autréaux, B. y Toledano, M. 2007. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Molecular Cell Biology* 8: 813-824.

del Pino, E.M., Ávila, M., Pérez, O., Benítez, M., Alarcón, I., Noboa, V., Moya, I. 2004. Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *International Journal of Developmental Biololy* 48: 663–670.

Devireddy, R., Swanlund, D., Roberts, K., Pryor, J., Bischof, J. 2000. The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing. *Human Reproduction* 15: 1125-1135.

Dimethyl Sulfoxide Organization. 2012. Physical Properties of Dimethyl Sulfoxide and its function in biological Systems. [en línea]. <<http://dmso.org/articles/information/szmant.html>> [Consultado: mayo del 2012].

Fickel, J., Wagener, A., Ludwig, A. 2007. Semen cryopreservation and conservation of endangered species. *European Journal of Wildlife Research* 53: 81-89.

Finn, R. 2007. The physiology and toxicology of salmonid eggs and larvae in relation to water quality criteria. *Aquatic Toxicology* 81: 337–354.

Fuller, B. 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters* 25(6): 375-388.

Gilbert, S. 2010. *Developmental Biology*. Novena Edición. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Massachusetts, USA.

Hammerstedt, R., Graham, J., Nolan, J. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology* 11: 73-88.

- He, S. y Woods III, C. 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology* 48: 254-262.
- Hill, R., Wyse, G., Anderson, M. 2008. *Animal Physiology*. Second Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, USA.
- Hoagland, H. y Pincus, G. 1942. Revival of mammalian sperm after immersion in liquid nitrogen. *The Journal of General Physiology*.
- Layne, J. y Jones, A. 2001. Freeze tolerance in the gray treefrog: cryoprotectant mobilization and organ dehydration. *Journal of Experimental Zoology* 290:1–5
- Lee, M. y Jamieson, B. 1993. The ultrastructure of the spermatozoa of bufonid and hylid frogs (Anura, Amphibia): implications for phylogeny and fertilization biology. *Zoologica Scripta* 22: 309-323.
- Lee, R. y Costanzo, J. 1998. Biological ice nucleation and ice distribution in cold-hardy ectothermic animals. *Annual Review of Physiology* 60: 55-72.
- Moya, I., Alarcón, I., del Pino, E.M. 2006. Gastrulation of *Gastrotheca riobambae* in comparison with other frogs. *Developmental Biology* 304: 467-478.
- Parkes, A. 1945. Preservation of human spermatozoa at low temperatures. *British Medical Journal*.
- Pašková, V., Hilscherová, K., Bláha, L. 2011. Teratogenicity and embryotoxicity in aquatic organisms after pesticide exposure and the role of oxidative stress. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 211: 25-61.

Polge, C., Smith, A., Parkes, A. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.

Pough, H., Janis, C., Heiser, J. 2005. *Vertebrate Life*. Seventh Edition. Pearson Prentice Hall. New Jersey, USA.

Ron, S., Guayasamin, J., Menéndez-Guerrero, P. 2011. Biodiversity and Conservation Status of Ecuadorian Amphibians. En: *AmphibiaWebEcuador* 2013. Disponible en: <<http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios/AnfibiosEcuador/Conservacion.aspx>> [Consultado: Enero del 2013].

Rubinsky, B. 2003. Principles of low temperature cell preservation. *Heart Failure Reviews* 8: 277-284.

Sargent, M., Mohun, T. 2005. Cryopreservation of sperm of *Xenopus laevis* and *Xenopus torpicalis*. *Wiley-Liss* 41: 41-46.

Sive, H., Grainger, R., Harland, R. 2000. *Early Development of Xenopus laevis*. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

Society for Cryobiology. 2013. What is cryobiology? [en línea]. <http://www.societyforcryobiology.org/index.php?option=com_content&view=article&id=41:what-is-cryobiology-&catid=21:about&Itemid=111> [Consultado: marzo del 2013].

Solís, F., Ibáñez, R., Hammerson, G., Hedges, B., Diesmos, A., Matsui, M., Hero, J., Richards, S., Coloma, L., Ron, S., La Marca, E., Hardy, J., Powell, R., Bolaños, F., Chaves, G., Ponce, P. 2009. *Rhinella marina* [en línea]. <<http://www.iucnredlist.org/details/41065/0>> [Consultado: Enero 2013].

- Sum, A. y Pablo, J. 2003. Molecular simulation study on the influence of dimethylsulfoxide on the structure of phospholipid bilayers. *Biophysical Journal* 85: 3636-3645.
- The, R. y Hasselbach, W. 1977. Stimulatory and inhibitory effects of Dimethyl Sulfoxide and Ethylene Glycol on ATPase activity and calcium transport of sarcoplasmic membranes. *European Journal of Biochemistry* 74: 611-621.
- Tian, J., Gong, H., Thomsen, G., Lennarz, W. 1997. Gamete interactions in *Xenopus laevis*: identification of sperm binding glycoproteins in the egg vitelline envelope. *The Journal of Cell Biology* 146(5): 1099-1108.
- Tiersch, T. 2001. Cryopreservation in aquarium fishes. *Marine Biotechnology* 3: 212-223.
- Viveiros, A., Godinho, H. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian fresh water fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry* 35: 137-150.
- Whitaker, B. 2001. *Reproduction en Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Krieger Publishing Company. Florida, USA.
- Wolfe, J. y Bryant, G. 1999. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology* 39: 103-129.
- Wright, K. 2001. *Restraint Techniques and Euthanasia en Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Krieger Publishing Company. Florida, USA.
- Young, B., Lips, K., Reaser, J., Ibáñez, R., Salas, A., Cedeño, R., Coloma, L., Ron, S., La Marca, E., Meyer, J., Muñoz, A., Bolaños, F., Chaves, G., Romo, D. 2001. Population Declines and Priorities for Amphibian Conservation in Latin America. *Conservation Biology* 15: 1213-1223.

8. FIGURAS

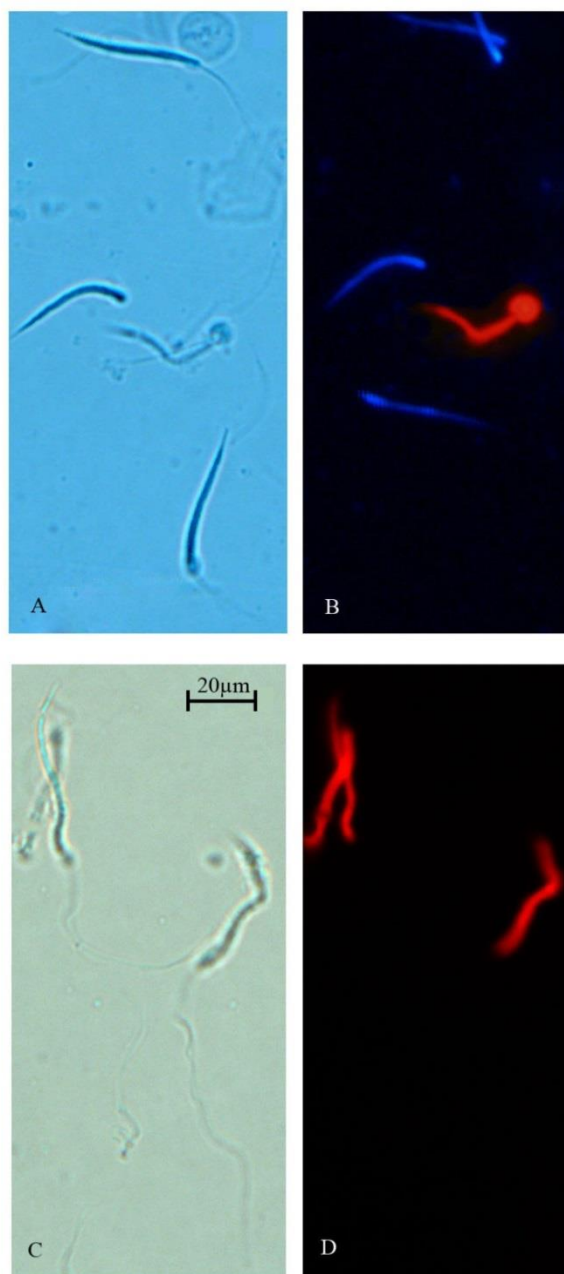


Figura 1. Efectos del congelamiento en espermatozoides de *R. marina* descongelados luego de seis meses. La solución contenía los tintes Propidium Iodide (PI) y Hoescht. A y B. Espermatozoides que no han sido congelados/descongelados. C y D. Espermatozoides congelados/descongelados. A y C. Micrografía con luz normal. B y D. Micrografía con filtros fluorescentes DAPI y FITC. La barra que indica referencia de medida sirve para todas las micrografías.

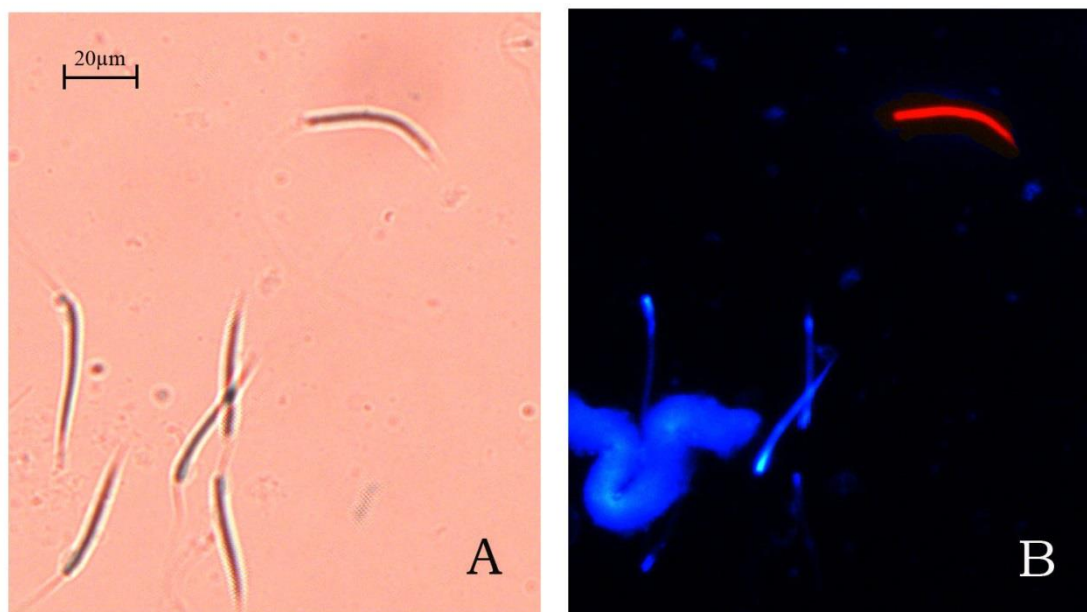


Figura 2. Espermatozoides provenientes de una muestra fresca en solución SB e incubada con los tintes PI y Hoescht. A. Luz normal. B. Luz fluorescente (filtros FITC y DAPI), el tinte PI sólo penetró la membrana de uno de estos espermatozoides. La barra indica la medida en ambas micrografías.

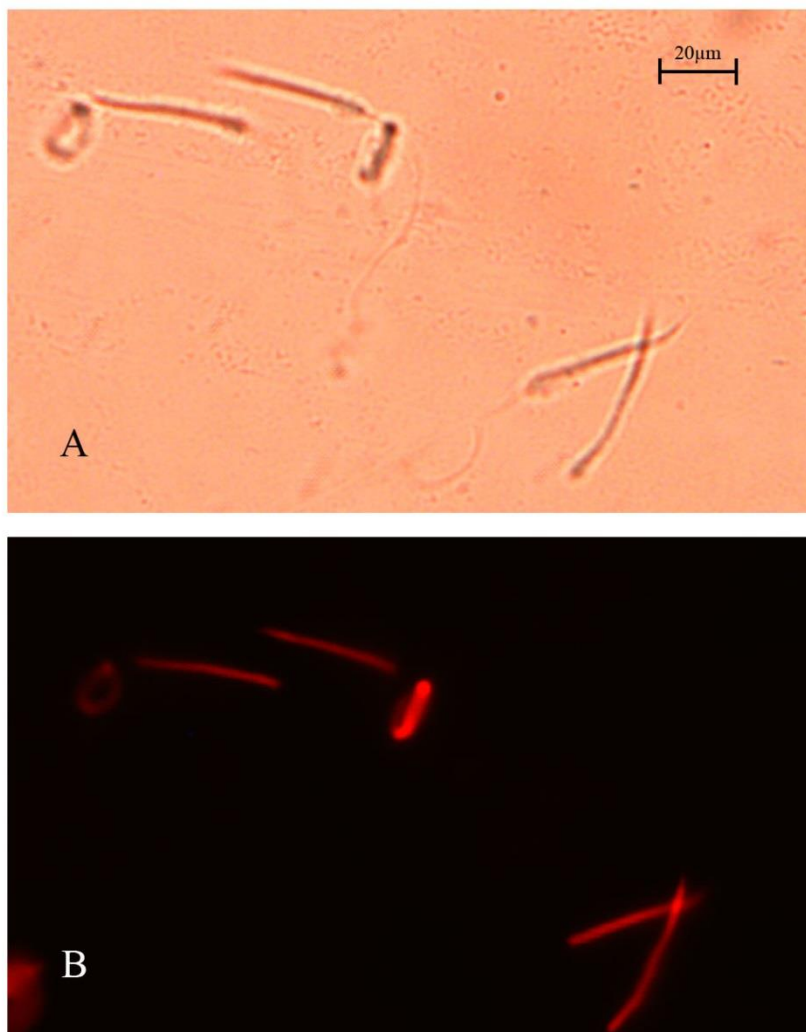


Figura 3. Espermatozoides de *R. marina* descongelados a los seis meses incubados con los tintes PI y Hoescht. A. Micrografía con luz visible. B. Micrografía bajo filtro de luz FITC y DAPI, sólo puede verse el tinte PI. La barra indica la medida en ambas partes.

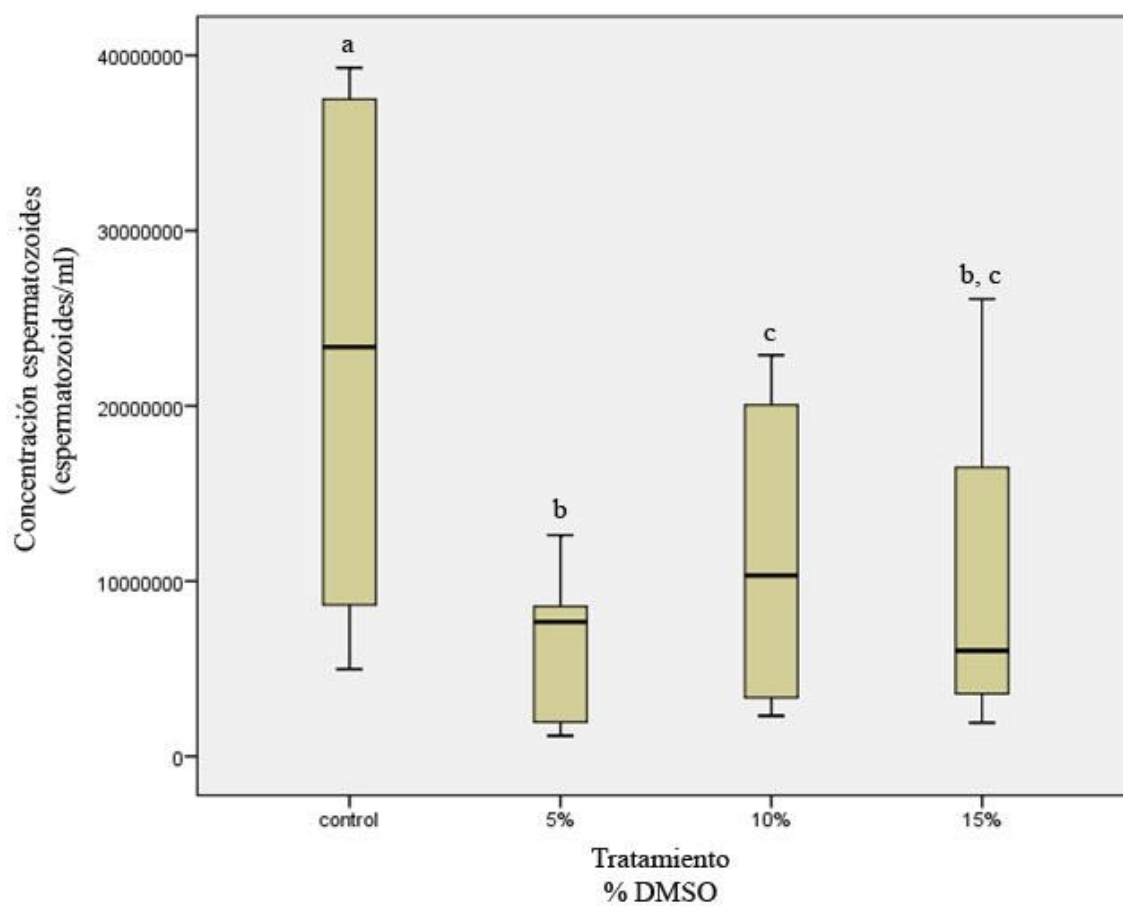


Figura 4. Concentración de espermatozoides descongelados a la semana en relación con la concentración de DMSO. Las letras indican los subgrupos formados en el análisis post-hoc (para ello se usaron transformaciones logarítmicas).

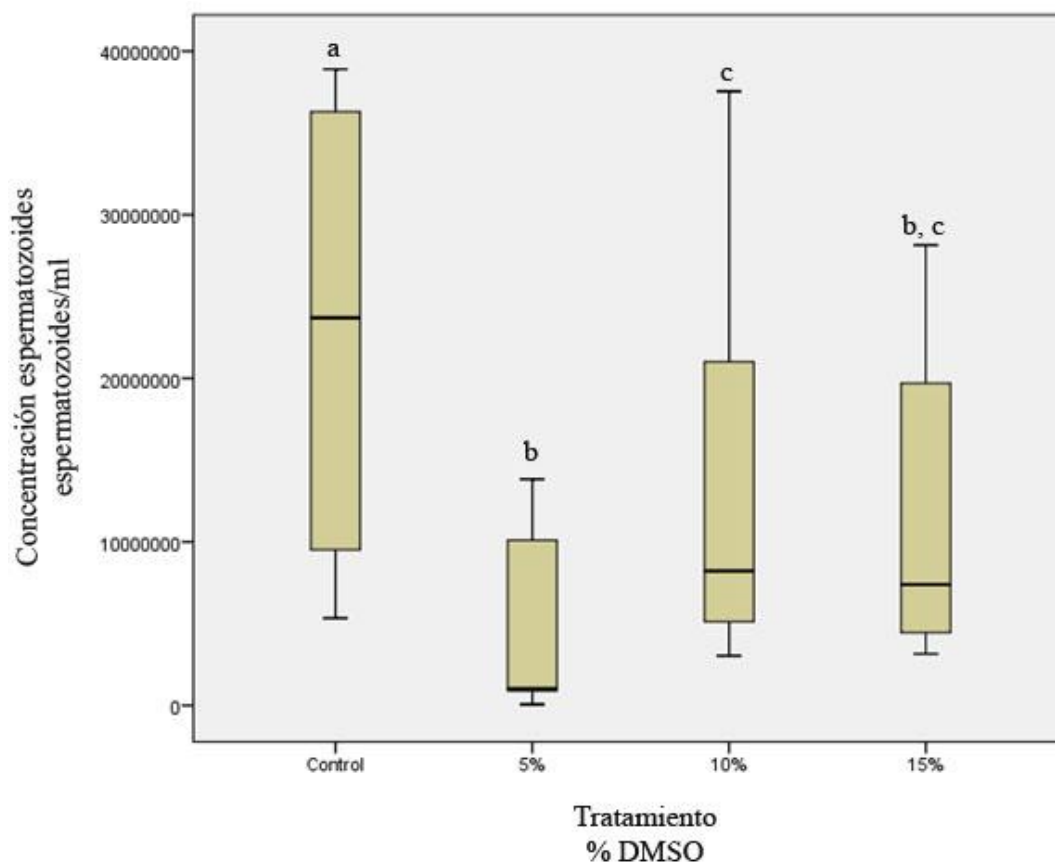


Figura 5. Concentración de espermatozoides descongelados a los seis meses en relación con la concentración de DMSO, el control es el mismo que el usado en febrero. Las letras indican los subgrupos obtenidos en los análisis post-hoc.

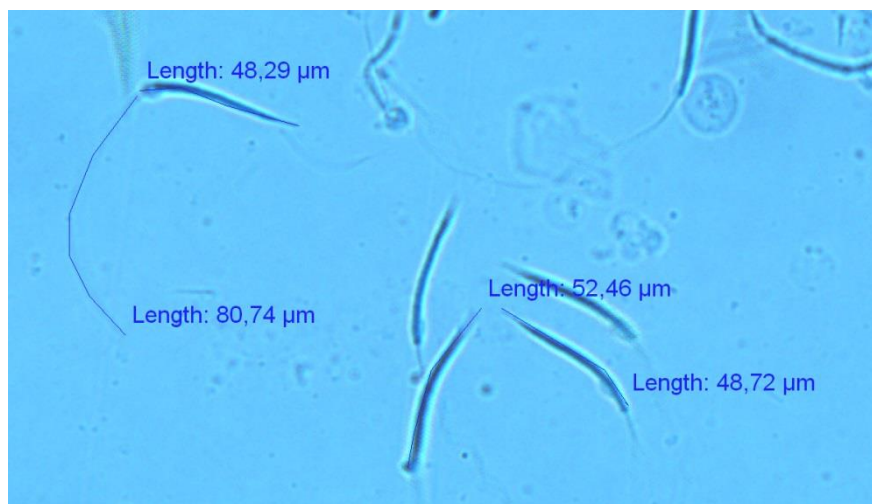


Figura 6. Medidas de espermatozoides de *R. marina* que no han sido sometidos a congelamiento/descongelamiento.

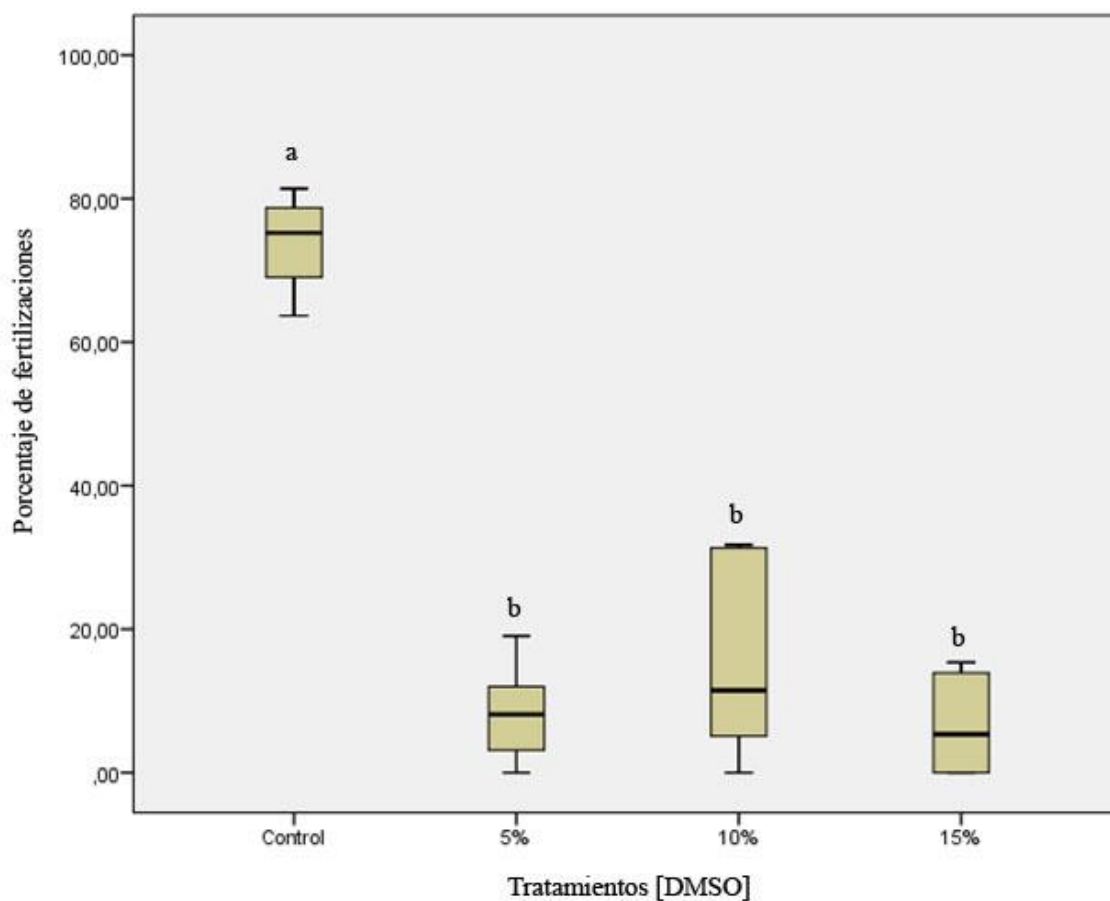


Figura 7. Porcentajes de fertilizaciones exitosas (gástrulas) mediante fertilizaciones *in-vitro* con espermatozoides descongelados a temperatura ambiente en relación a la concentración de DMSO. Las letras indican los subgrupos obtenidos mediante el análisis post-hoc. Datos del porcentaje de fertilización transformados a función arcoseno.

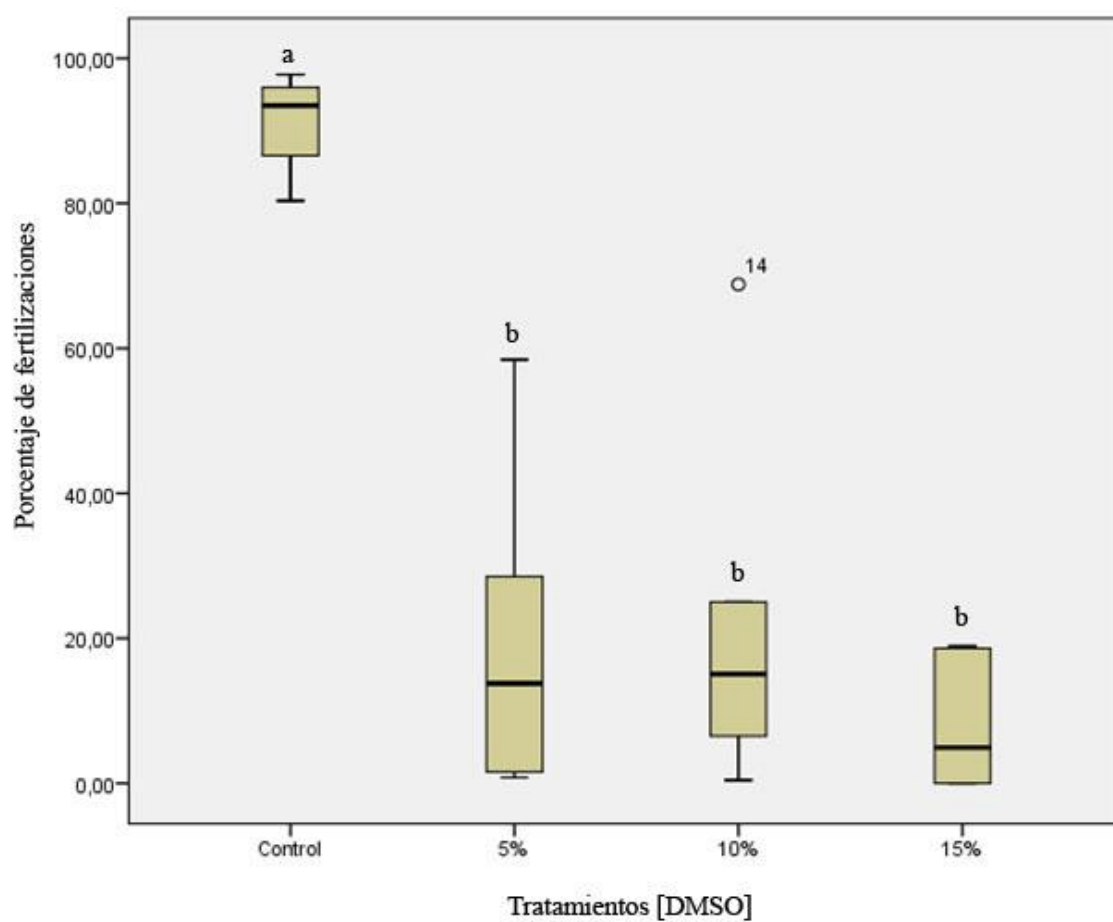


Figura 8. Porcentajes de fertilizaciones exitosas (gástrulas) mediante fertilizaciones *in-vitro* con espermatozoides descongelados a 4°C en relación a las concentraciones de DMSO.

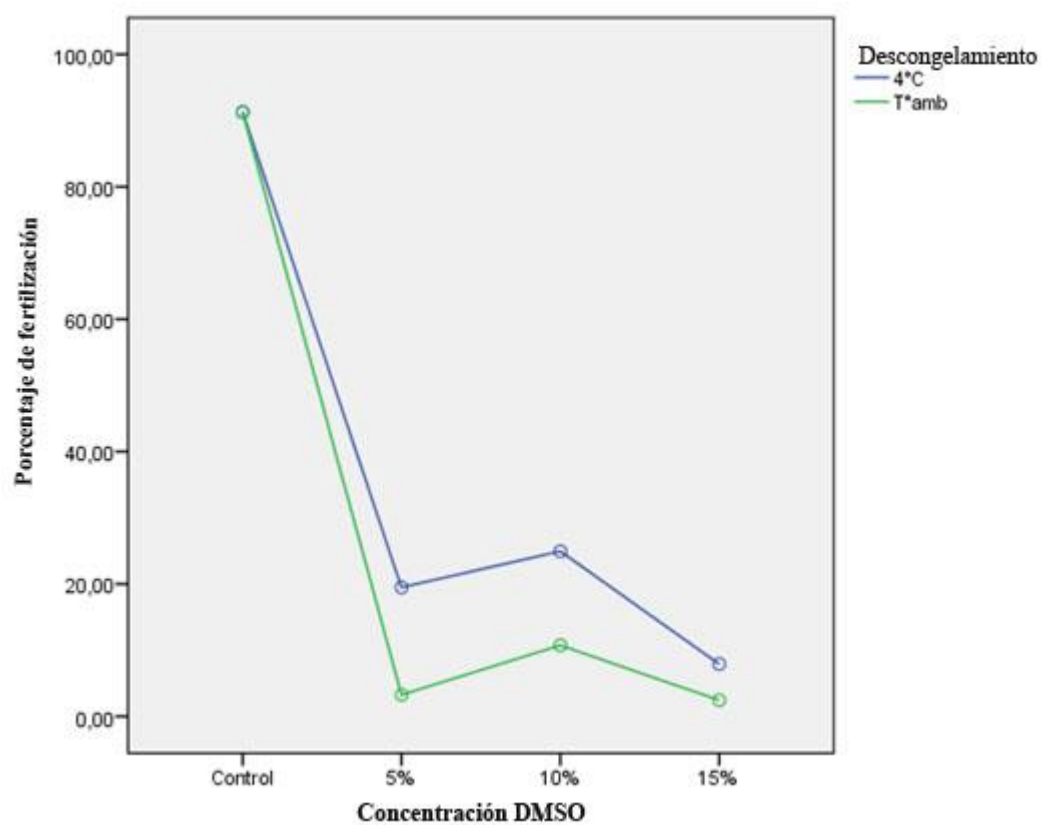


Figura 9. Porcentajes de fertilización obtenidos con espermatozoides descongelados a temperatura ambiente y a 4°C según el porcentaje de DMSO.

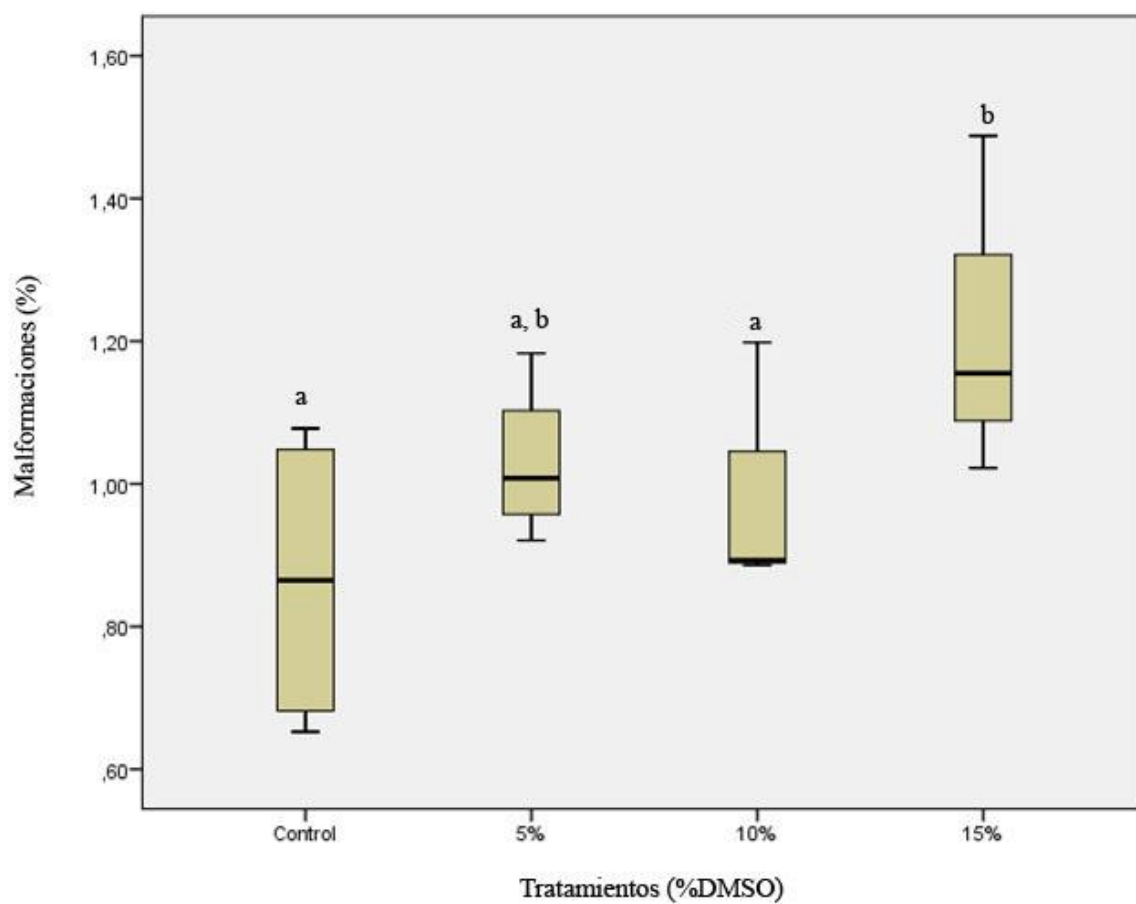


Figura 10. Porcentaje de malformaciones en larvas de *R. marina* obtenidas mediante fertilización *in-vitro* con espermatozoides descongelados a 4°C en relación a la concentración de DMSO. Gráfico obtenido con datos transformados logarítmicamente.

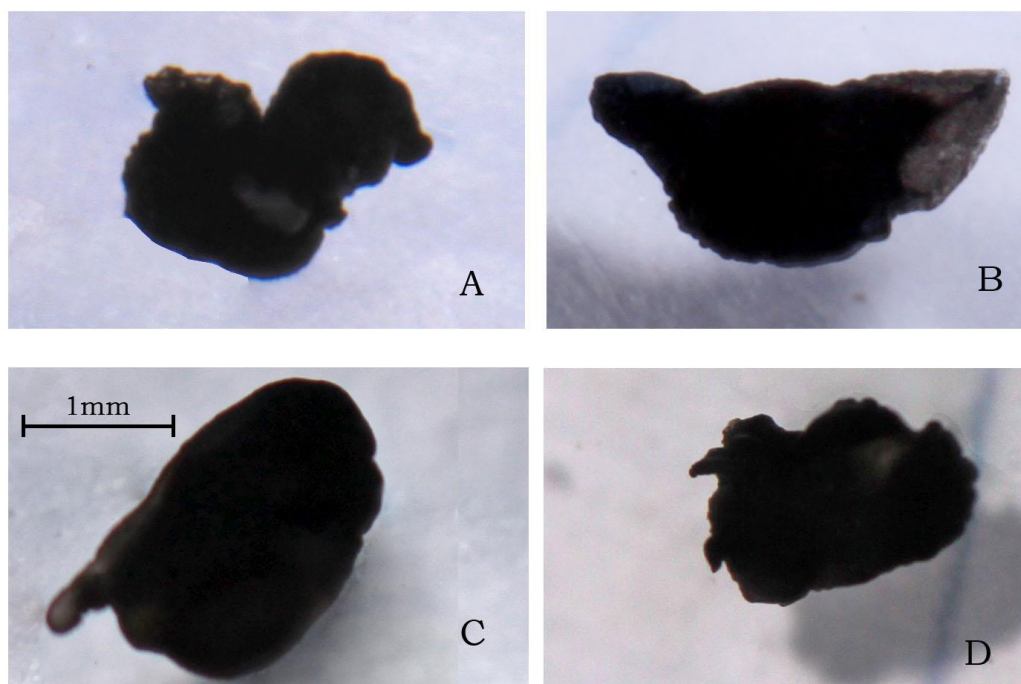


Figura 11. Malformaciones encontradas durante el estadio 19 en embriones de *R. marina* según el IDA. A y C. tipo 7. B. tipo 2. D. tipo 8. La barra en C es referencia para todas las fotos.

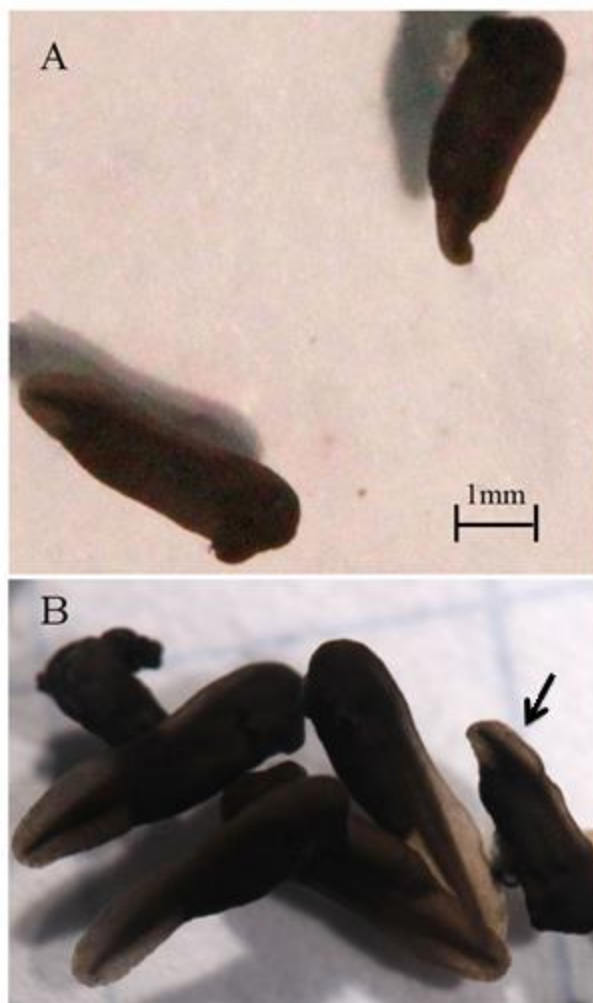


Figura 12. Malformaciones encontradas embriones de *R. marina* en estadio 19. A. colas de tamaño reducido. B. embriones sanos y uno con cola reducida. La barra en A es referencia para ambas fotos.

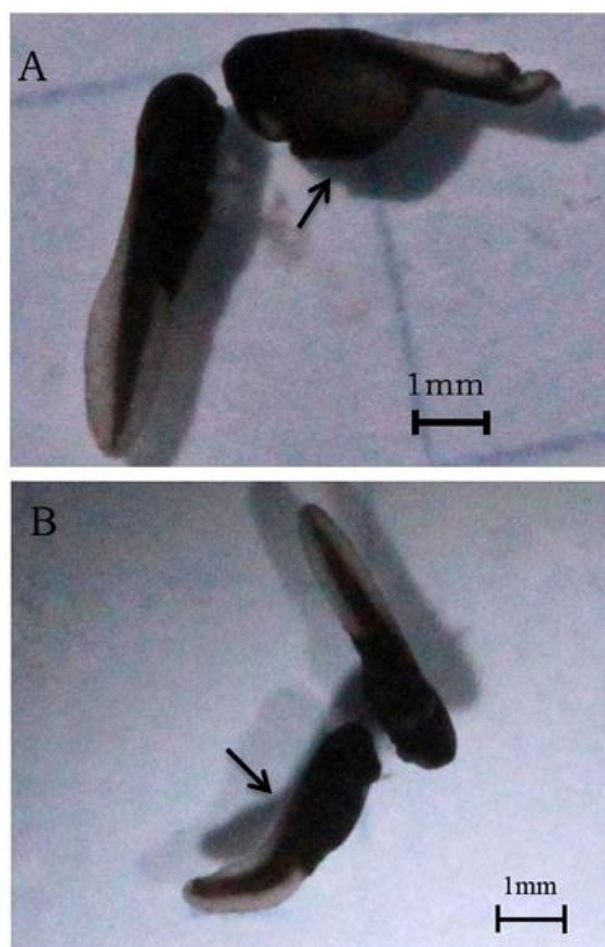


Figura 13. Malformaciones en embriones de *R. marina* en estadio 21. A. Edema. B. malformación de tipo 6 según IDA.

9. TABLAS

Tabla 1. Concentración de espermatozoides descongelados después de permanecer una semana a -80°C comparados con un control que no fue sometido al congelamiento/descongelamiento. M = media, DE = desviación estándar, esprmtzds = espermatozoides.

Tratamiento	ANOVA				Análisis post-hoc	
	M \pm DE	P	gl	F	Subgrupos	P
	(1 x 10 ⁷ esprmtzds/ml)					
Control	2,29 \pm 1,49				a	1.00
DMSO 5%	0,65 \pm 0,39	0.007	15	4.77	b	0.16
DMSO 10%	1,15 \pm 0,86				c	0.36
DMSO 15%	0,94 \pm 0,79				b,c	

Tabla 2. Concentración de espermatozoides descongelados a los 6 meses comparados con los datos control. M = media, DE = desviación estándar, esprmtzds = espermatozoides.

Tratamiento	ANOVA				Análisis post-hoc	
	M \pm DE	P	gl	F	Subgrupos	P
	(1 x 10 ⁷ esprmtzds/ml)					
Control	2,29 \pm 1,49				a	1.00
DMSO 5%	0,49 \pm 0,59	0.007	15	6.15	b	0.05
DMSO 10%	1,39 \pm 1,32				c	0.54
DMSO 15%	1,17 \pm 1,01				b,c	

Tabla 3. Diferencias entre concentración de espermatozoides descongelados a la semana (D1) y a los 6 meses (D2). Valores de *P* obtenidos mediante la prueba de Wilcoxon para 6 pares de datos. M = media, DE = desviación estándar, esprmtzds = espermatozoides, w^+ = rangos positivos, w^- = rangos negativos.

	D1	D2			
Tratamiento	M ± DE	M ± DE	P	w^+	w^-
	(1 x 10⁷ esprmtzds/ml)	(1 x 10⁷ esprmtzds/ml)			
DMSO 5%	0,65 ± 0,39	0,49 ± 0,59	0.46	14	7
DMSO 10%	1,15 ± 0,86	1,39 ± 1,32	0.60	8	13
DMSO 15%	0,94 ± 0,79	1,17 ± 1,01	0.11	3	18

Tabla 4. Porcentaje de fertilizaciones exitosas (gástrulas) mediante fertilizaciones *in-vitro* con espermatozoides descongelados a temperatura ambiente. M = media, DE = desviación estándar.

	ANOVA				Análisis post-hoc	
Tratamiento	M ± DE	P	gl	F	Subgrupos	P
	%					
Control	91,28 ± 07,58				a	1.00
DMSO 5%	03,26 ± 04,00	<0.001	15	93.97	b	0.07
DMSO 10%	10,73 ± 13,14				b	
DMSO 15%	02,44 ± 03,13				b	

Tabla 5. Porcentaje de fertilizaciones exitosas (gástrulas) mediante fertilizaciones *in-vitro* con espermatozoides descongelados a 4°C después de una semana.

Tratamiento	ANOVA				Análisis post-hoc	
	M ± DE %	P	gl	F	Subgrupos	P
Control	91,28 ± 07,58	<0.001	15	20.94	a	1.00
DMSO 5%	19,48 ± 21,73				b	0.17
DMSO 10%	23,17 ± 27,13				b	
DMSO 15%	07,90 ± 08.96				b	

Tabla 6. Porcentaje de malformaciones en larvas de *R. marina* obtenidas mediante fertilizaciones *in-vitro* con espermatozoides descongelados a 4°C después de una semana.

M = media, DE = desviación estándar.

Tratamiento	ANOVA				Análisis post-hoc	
	M ± DE %	P	gl	F	Subgrupos	P
Control	08,00 ± 03,74	0.015	15	8.25	a	0.1
DMSO 5%	10,99 ± 02,98				a,b	
DMSO 10%	10,43 ± 04,64				a	
DMSO 15%	18,52 ± 10,76				b	0.05

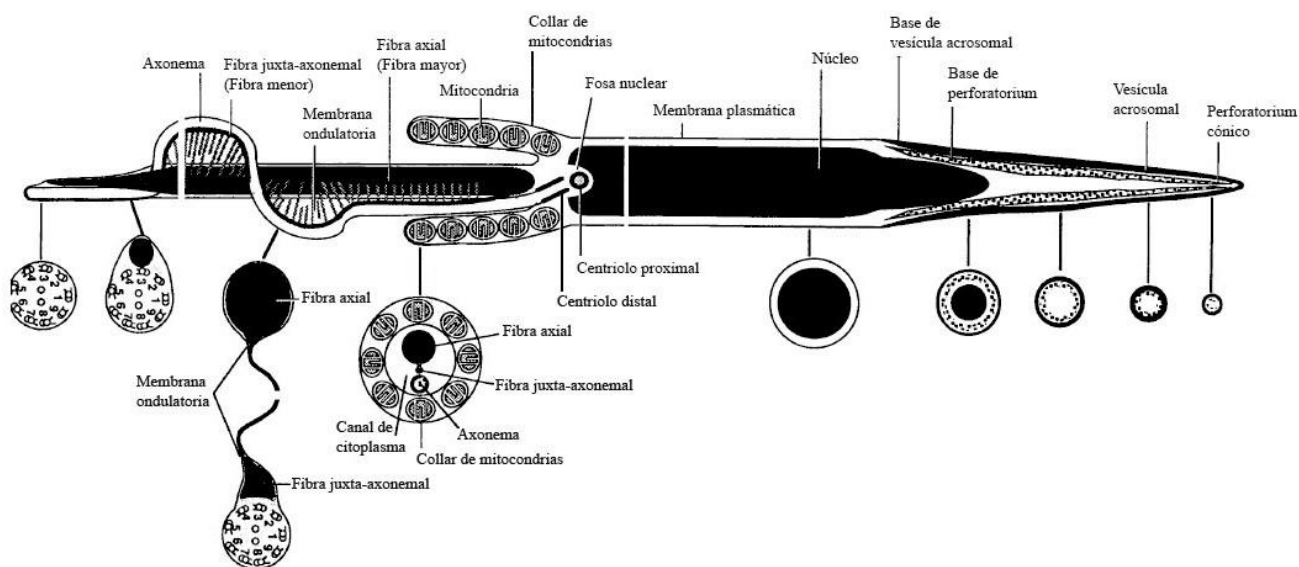
Tabla 7. Porcentajes de malformaciones en embriones de *R. marina* obtenidos con espermatozoides descongelados a 4°C. El total son los embriones fertilizados. F 4°C son las fertilizaciones con espermatozoides descongelados a 4°C, y FTA, con los descongelados a temperatura ambiente.

			Embriones malformados					Total	%	
			Total							
				Tipo 2	Tipo 6	Tipo 7	Tipo 8	Edema	anormales	
Control			834		22	15	2	1	40	4.79
F 4°C	DMSO 5%	165	1	6	1	1		6		
	DMSO 10%	132	1	3	1			2		
	DMSO 15%	61	3	4	2					
	Total	358	5	13	4	1		8	31	8.65
FTA	DMSO 5%	38		4						
	DMSO 10%	93		3						
	DMSO 15%	30		2						
	Total	161		9					9	5.59

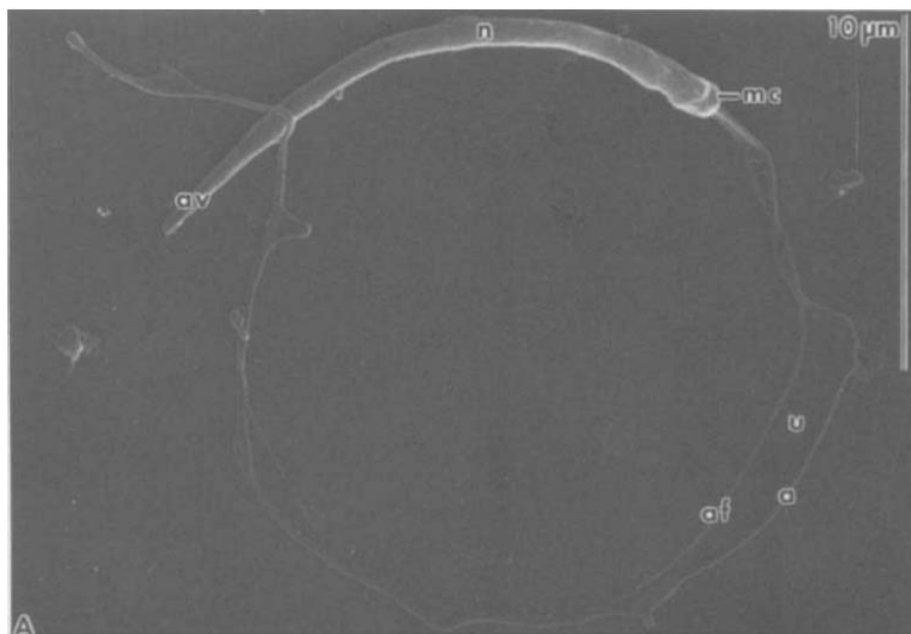
Tabla 8. Metamorfos obtenidos en las repeticiones de cada tratamiento.

Tratamiento		Macho	Metamorfos
	DMSO		
Descongelamiento	5%	1	2
temp. ambiente	5%	3	2
	5%	5	2
	10%	4	1
	15%	2	3
	15%	3	1
Total			11
Descongelamiento	5%	1	2
4°C	5%	3	1
	5%	4	3
	10%	6	1
	15%	4	2
	15%	5	1
	15%	1	1
Total			11

10. ANEXOS



Anexo 1. Diagrama de espermatozoide consenso de la familia Bufonidae-Pelodriadae (Lee y Jamieson, 1993).



Anexo 2. Tamaño del espermatozoide de *R. marina* de Australia descrito por Lee y Jamieson en 1993. av = vesícula acrosomal, n = núcleo, mc = collar de mitocondrias, u =membrana ondulatoria, a = axonema, af = fibra axial.

Eventos del desarrollo temprano	Tiempo post fertilización:		Estadio			
	Horas	Días	R	X	G	B
Fertilización	-	-	1	1	1	1
Media luna gris (no se pudo fotografiar)	1 hora: 40 minutos	-	2	1+	2	2
Primer clivaje: 2 células	2 horas: 15 minutos	-	2+	2	3	3
Segundo clivaje: 4 células	2 horas: 25 minutos	-	3	3	4	4
Tercer clivaje: 8 células	2 horas: 35 minutos	-	4	4	5	5
Cuarto clivaje: 16 células	4 horas: 45 minutos	-	5	5	6	6
Quinto clivaje: 32 células	5 horas: 5 minutos	-	6	6	7	-
+ 32 células	5 horas: 25 minutos	-	7	7	8	7
Blástula + 64 células	6 horas: 40 minutos	-	8	8	8+	8
Blástula media			9	9	9	9
Inicio de la gástrula (apareció labio del blastoporo)	1 día: 11 horas		10+	10	10	10
Gástrula temprana (tapón de yema)	1 día: 19 horas		11	11	11	11
Gástrula media (reducción tapón de yema)	2 días: 2 horas		12	12	12	11
Gástrula media (reducción tapón de yema)	2 días: 17 horas		12+	12+	12	12
Gástrula tardía (muy reducido tapón de yema)	3 días: 4 horas		13	13	13	12
Gástrula tardía (cierre del blastoporo)	3 días: 18 horas		13+	14	14	12
Inicio neurula: placa neural	3 días: 23 horas		14	15	14	13
Neurula media: Pliegues neurales inicio	4 días: 2 horas		15	17	15	14
Neurula media: Surco neural	4 días: 6 horas		16	20	16	15
Neurula media: Tubo neural	4 días: 9 horas		17	24	17	16
Neurula tardía: tubo neural completo, abultamiento de futuras branquias	6 días: 00 horas		18	26	18	16
Cuerpo de la cola: formación de glándula de cemento	7 días: 17 horas		19	-	-	17
Primeros nacimientos	8 días: 10 horas		19+	33	19	17
Contracciones musculares, arcos branquiales, fosas nasales	10 días: 6 horas		20	40	20	18
Comienzo de latidos del corazón, externalizan las branquias	11 días: 6 horas		21	40+	20+	19
Se abre la boca, se transparenta la córnea, se elonga la cola e inicia la desaparición de la glándula de cemento	12 días: 7 horas		22	41	21	21
Desarrollo del ojo, ramifican las branquias, circulación en el ala de la cola	13 días: 14 horas		23	42	22	22
Opérculo cubren la base de las branquias, desarrollo de los denticulos	14 días: 14 horas		24	43	23	24
Opérculo encierra a las branquias derecha,	41 días: 14 horas		25	44	24	25
Desarrollo del espiráculo	77 días: 14 horas		26	48	25	25
Patas traseras	89 días: 14 horas		27+	-	26	26
Patas delanteras			41	-	41	40
Primer subadulto			46	66	46	46

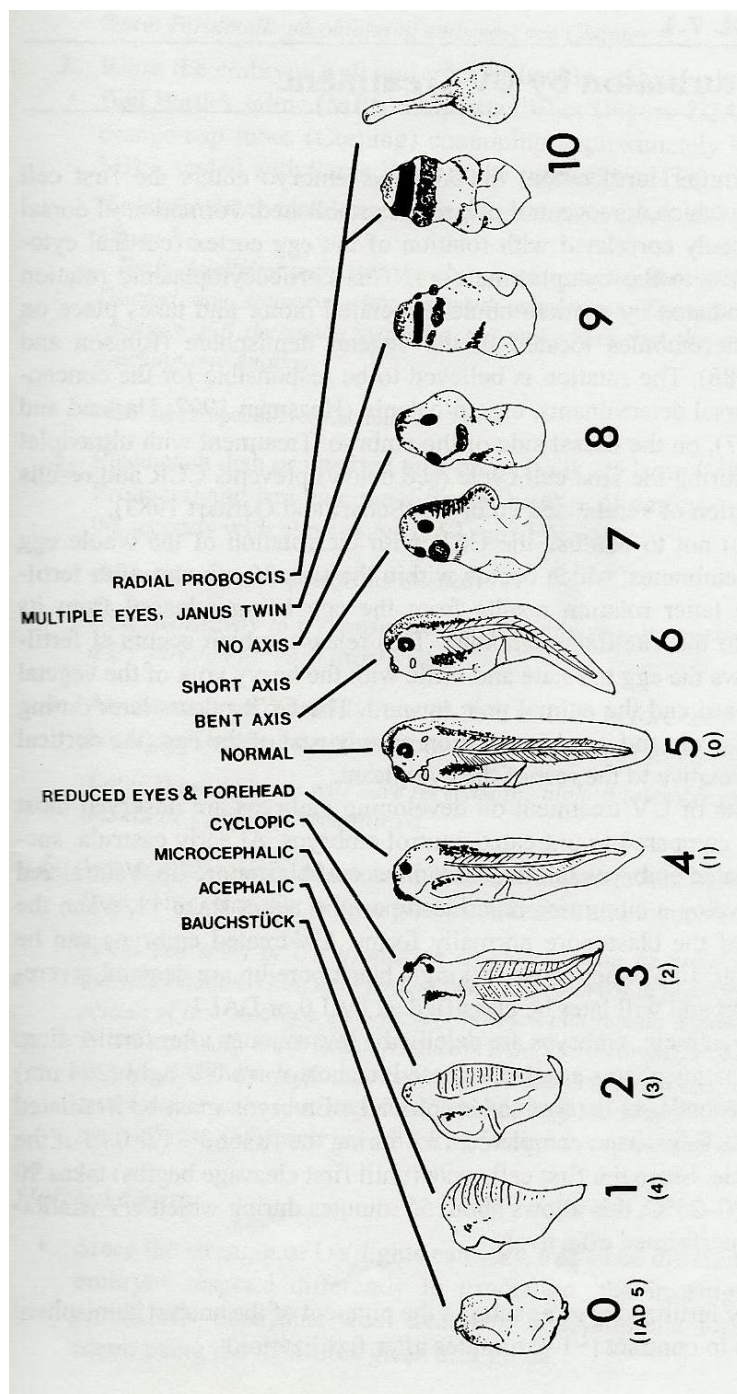
R: estadios de *Rhinella marina*

X: estadios embrionarios según la tabla normal del desarrollo de *Xenopus laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1994)

G: estadios embrionarios según la tabla normal de desarrollo de Gosner (1960)

B: estadios embrionarios identificados en el desarrollo temprano de *Bufo valliceps* (Limbaugh y Volpe, 1957)

Anexo 3. Tabla parcial de desarrollo de *Rhinella marina* (Bautista, 2012).



Anexo 4. Índice dorsoanterior (IDA) para malformaciones en embriones de *Xenopus laevis* (Sive *et al.*, 2000).

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Concentra	18,592	3	40	,000
Log	,538	3	40	,659

Anexo 5. Test de homogeneidad de varianzas para datos correspondientes a la concentración de espermatozoides de muestras descongeladas en febrero. Datos sin transformar (Concentra) y datos transformado logarítmicamente (Log).

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Fertlzcns	7,705	3	18	,002
Log	5,914	3	18	,005
Raíz	5,185	3	18	,009
Arsin	2,344	3	18	,107

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Fertlzcns	Log	Raíz	Arsin
N		22	22	22	22
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	21.0795	,7940	3,5191	21,6841
	Std. Deviation	34.85112	,71417	3,18699	26,83952
Most Extreme Differences	Absolute	,345	,158	,262	,271
	Positive	,345	,158	,262	,271
	Negative	-,273	-,133	-,215	-,210
Kolmogorov-Smirnov Z		1,618	,739	1,228	1,271
Asymp. Sig. (2-tailed)		,011	,646	,098	,079

Anexo 6. Pruebas de homogeneidad de varianzas y normalidad de los datos correspondientes a porcentajes de fertilización obtenidos con espermatozoides descongelados a temperatura ambiente. Datos sin transformar (Fertlzcns) y datos transformados a Logaritmo (Log), Raíz cuadrada (Raíz) y función Arcoseno (Arsin).

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Porcentaje	4,923	3	10	,024
Log	2,078	3	10	,167

Anexo 7. Prueba de homogeneidad de varianzas para datos de porcentaje de malformaciones en embriones con espermatozoides descongelados a 4°C en cada tratamiento. Datos sin transformar (Porcentaje) y transformados a Logaritmo (Log).